

Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Herstellung von Mikroarrays für die diagnostische und analytische Anwendung

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Denis Grote-Koska
aus Salzgitter

1. Referentin: Prof. Dr. Ursula M. Bilitewski
2. Referent: Prof. Dr. Stefan Schulz
eingereicht am: 13.04.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 01.07.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Koska, D., Frank, R.: Development of a novel microarray format for analytical and diagnostic applications. (Poster) 9. Deutsches Peptidsymposium, Göttingen (2009).

Koska, D., Frank, R.: Development of a novel microarray format for analytical and diagnostic applications. (Poster) 5. Statusseminar ChemBioNet, Frankfurt (2008).

Koska, D., Frank, R.: Novel fabrication process for manufacturing series of identical copies of microarrays for analytical and diagnostic applications. (Poster) 4. Statusseminar ChemBioNet, Frankfurt (2007).

*Man muß das Unmögliche versuchen,
um das Mögliche zu erreichen.
(Hermann Hesse)*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung und Aufgabenstellung	11
1.1 Diagnostik	11
1.1.1 Nukleinsäuren als diagnostische Sondenmoleküle.....	11
1.1.2 Proteine als diagnostische Sondenmoleküle	12
1.1.3 Peptide als diagnostische Sondenmoleküle.....	13
1.2 Mikroarrays	14
1.2.1 Mikroarrays auf Biomolekülbasis.....	15
1.2.1.1 Nucleinsäurebasierte Mikroarrays	15
1.2.1.2 Proteinbasierte Mikroarrays.....	20
1.2.1.3 Peptidbasierte Mikroarrays.....	22
1.2.2 Mikroarrays auf Basis kleiner organischer Moleküle.....	24
1.3 Die Generierung von Substanzbibliotheken	25
1.3.1 Methoden der kombinatorischen Festphasensynthese	25
1.3.2 Herstellung von Mikroarrays aus cellulosegebundenen Substanzen ...	27
1.4 Mikroarrays in der klinischen Diagnostik	28
1.5 Hürden für die medizinisch diagnostische Anwendung.....	29
1.6 Zielsetzung.....	30
1.6.1 Konzept der Arbeit.....	30
1.6.2 Der Faden-Array.....	30
1.6.3 Die Molekülbibliothek.....	32
2 Faden-Array	34
2.1 Anforderungen an das Fadenmaterial	34
2.1.1 Fasermaterialien industrieller Herstellung.....	34
2.1.2 Cellulose als Fadenmaterial	35
2.1.3 Untersuchung des Fadenmaterials	36
2.1.3.1 Stabilität gegenüber Synthesereagenzien.....	36
2.1.3.2 Aminierung und chemische Stabilisierung	37
2.1.3.3 Einfluss verschiedener Additive auf die Fäden	41
2.1.3.4 Durchlässigkeit gegenüber kleinen Molekülen und Peptiden	45
2.1.3.5 Einfluss der Funktionalisierung auf Fadendicke und Reißfestigkeit.....	50
2.1.3.6 Untersuchung der Faserstruktur mittels TEM.....	51
2.1.4 Versuche zur Direktsynthese am Lyocellträger.....	52
2.1.4.1 Direktsynthese eines Tripeptids an Lyocellfäden.....	52
2.1.4.2 Direktsynthese eines substituierten Purins an Lyocellfäden.....	55
2.2 Faserbündel und Kryo-Schnitte	57
2.2.1 Haftung von Schnitten auf verschiedenen Glasobjektträgern.....	59
2.2.2 Einfluss der Schnittdicke auf die Fadenanordnung.....	59
2.2.3 Versuche zur Optimierung der Faseranordnung im 19er Bündel (1)....	61
2.2.4 Versuche zur Optimierung der Faseranordnung im 19er Bündel (2)....	62

2.3	Proteinbindungstests an Fadenquerschnitten	63
2.3.1	Sondendetektion an Faden-Arrays aus 7er Bündeln	64
2.3.2	Untersuchung der Homogenität eines Bündels.....	67
3	Substanzbibliothek.....	69
3.1	Optimierte Einzelsynthese von 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin	71
3.1.1	Kopplung des Fmoc-Rink Linkers an Celluloseträger	72
3.1.2	Kopplung von Fmoc-Aminosäuren an Celluloseträger	72
3.1.3	Kopplung des Puringrundgerüsts an eine Aminosäure.....	73
3.1.4	Derivatisierung der N-9 Position des Puringrundgerüsts	75
3.1.5	Derivatisierung der C-2 Position des Puringrundgerüsts	77
3.2	Optimierung der Einzelsynthese.....	79
3.2.1	Optimierung der Purinkopplung an ES.1.....	79
3.2.2	Optimierung der Substitutionen an N-9 und C-2.....	80
3.2.2.1	Substitution an N-9 vor C-2 mit Phe als Aminosäure.....	80
3.2.2.2	Substitution an C-2 vor N-9 mit Phe als Aminosäure.....	83
3.2.2.3	Substitution an N-9 vor C-2 mit Pro als Aminosäure.....	86
3.2.3	Tests weiterer Substituenten.....	88
3.2.3.1	Tests verschiedener Aminosäuren für die Modellreaktion	88
3.2.3.2	Tests verschiedener Halogenide für die Modellreaktion	91
3.2.3.3	Tests verschiedener Amine für die Modellreaktion	92
3.3	Versuch einer Bibliothekssynthese per SPOT-Methode	92
3.3.1	Vorbereitungen zur SPOT-Synthese.....	93
3.3.2	Cyclus 0: Spotten von Raster und Kontrollspots.....	94
3.3.3	Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren an den Membranen.....	95
3.3.4	Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüsts auf SP.1	96
3.3.5	Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüsts auf SP.2	97
3.4	Bibliothekssynthese nach der Cut & Combine Methode	101
3.4.1	Versuche zur Auflösung von APEG-Aminocellulose.....	102
3.4.2	Einfluss des Auflösungsreagenzes auf ein trisubstituiertes Purin	104
3.4.3	Cyclus 0: Kopplung von Spacer und Linker	105
3.4.4	Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren an die Celluloseträger	106
3.4.5	Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüsts an CnC.1.....	107
3.4.6	Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüsts auf CnC.2	107
3.4.7	Cyclus 4: Derivatisierung an C-2 des Puringrundgerüsts auf CnC.3	110
3.4.8	Charakterisierung der Reaktionskontrollen	113
3.5	Proteinbindungstests an der Purinbibliothek	116
3.5.1	Enzymatische Auflösung von Cellulose-Spots.....	117
3.5.1.1	Einfluss des Lösemittels	117
3.5.1.2	Einfluss der Behandlungsdauer.....	118
3.5.2	Purvalanol B als Kontrollsonde	120
3.5.3	Herstellung von Purin-Mikroarrays auf Glas Slides	122
3.5.4	Bindungstests von Kinasen an der Purinbibliothek.....	124
3.5.4.1	Einfluss von Blockierungspuffern	124
3.5.4.2	Bindungstests verschiedener Kinasen	126
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	130
4.1	Zusammenfassung	130

4.2	Ausblick.....	134
5	Materialien und Methoden	136
5.1	Verwendete Geräte und Materialien.....	136
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften: Faden-Array.....	139
5.2.1	Lagerung.....	139
5.2.2	Funktionalisierung und Immobilisierung.....	139
5.2.3	Quantifizierung per Bromphenolblau.....	140
5.2.4	Bündelherstellung.....	140
5.2.5	Übertragung von Fadenquerschnitten auf Glasobjektträger.....	140
5.2.6	Durchführung biologischer Bindungstests auf Fadenquerschnitten ..	140
5.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften: Purinbibliothek	141
5.3.1	Vorbereitung der Celluloseträger	141
5.3.2	Lagerung.....	141
5.3.3	Allgemeine Reaktionsführung	142
5.3.4	Spezielle Reaktionsführung in der Mikrowelle	142
5.3.5	Aufarbeitung der Reaktionsansätze	142
5.3.6	Nachweis von Aminogruppen mit Bromphenolblau	143
5.3.7	Blockieren von nicht umgesetzten Aminogruppen.....	143
5.3.8	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.....	143
5.3.9	Ausbeutebestimmung über die Fmoc-Schutzgruppe.....	144
5.3.10	Abspaltung des Produktes vom Träger.....	144
5.3.11	Durchführung einer LC/MS Charakterisierung.....	145
5.3.12	Auflösung von Cellulose nach dem SC ² -Verfahren	145
5.3.13	Spotten von Mikroarrays aus den Stammlösungen	146
5.3.14	Proteinbindungstests auf gespotteten Mikroarrays.....	146
5.4	Spezielle Arbeitsvorschriften: Faden-Array	147
5.4.1	Untersuchung des Fadenmaterials	147
5.4.1.1	Stabilität gegenüber Synthesereagenzien.....	147
5.4.1.2	Aminierung und chemische Stabilisierung	147
5.4.1.3	Einfluss verschiedener Additive auf die Fäden	148
5.4.1.4	Durchlässigkeit gegenüber kleinen Molekülen und Peptiden	148
5.4.1.5	Einfluss der Funktionalisierung auf Fadendicke und Reißfestigkeit	149
5.4.1.6	Untersuchung der Porosität per TEM.....	149
5.4.1.7	Versuche zur Direktsynthese am Lyocellträger.....	149
5.4.2	Faserbündel und Kryo-Schnitte.....	150
5.4.2.1	Haftung von Schnitten auf verschiedenen Glasobjektträgern.....	150
5.4.2.2	Einfluss der Schnittdicke auf die Fadenanordnung.....	151
5.4.2.3	Versuche zur Optimierung der Faseranordnung im 19er Bündel ..	151
5.4.3	Proteinbindungstests an Fäden.....	151
5.4.3.1	Sondendetektion an Faden-Arrays aus 7er Bündeln	151
5.4.3.2	Untersuchung der Homogenität eines Bündels.....	152
5.5	Spezielle Arbeitsvorschriften: Substanzbibliothek.....	152
5.5.1	Optimierte Einzelsynthese: 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin..	152
5.5.1.1	Kopplung des Fmoc-Rink Linkers an Celluloseträger	152
5.5.1.2	Kopplung von Fmoc-Aminosäuren an Celluloseträger.....	153
5.5.1.3	Kopplung des Puringrundgerüsts an eine Aminosäure.....	153

5.5.1.4	Derivatisierung der N-9 Position des Puringrundgerüstes	153
5.5.1.5	Derivatisierung der C-2 Position des Puringrundgerüstes	154
5.5.2	Optimierung der Purinkopplung an ES.1	154
5.5.3	Optimierung der Substitutionen an N-9 und C-2	154
5.5.3.1	Substitution an N-9 vor C-2 mit Phe als Aminosäure	155
5.5.3.2	Substitution an C-2 vor N-9 mit Phe als Aminosäure	155
5.5.3.3	Substitution an N-9 vor C-2 mit Pro als Aminosäure	156
5.5.4	Tests weiterer Substituenten	157
5.5.4.1	Tests verschiedener Aminosäuren für die Modellreaktion	157
5.5.4.2	Tests verschiedener Halogenide für die Modellreaktion	157
5.5.4.3	Tests weiterer Amine für die Modellreaktion	157
5.6	Versuch einer Bibliothekssynthese per SPOT-Methode	157
5.6.1	Vorbereitungen zur SPOT-Synthese	157
5.6.2	Cyclus 0: Spotten von Raster und Kontrollspots	158
5.6.3	Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren auf die Membranen	158
5.6.4	Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüstes auf SP.1	158
5.6.5	Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüstes auf SP.2 ..	159
5.7	Bibliothekssynthese nach der Cut & Combine-Methode	160
5.7.1	Versuche zur Auflösung von APEG-Aminocellulose	160
5.7.2	Einfluss des Auflösungsreagenzes auf ein trisubstituiertes Purin	160
5.7.3	Cyclus 0: Kopplung von Spacer und Linker	160
5.7.4	Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren an die Celluloseträger	160
5.7.5	Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüstes an CnC.1	161
5.7.6	Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüstes auf CnC.2	161
5.7.7	Cyclus 4: Derivatisierung an C-2 des Puringrundgerüstes auf CnC.3	162
5.7.8	Charakterisierung der Reaktionskontrollen	162
5.8	Proteinbindungstests an der Purinbibliothek	162
5.8.1	Enzymatische Auflösung von Cellulose-Spots	162
5.8.2	Purvalanol B als Kontrollsonde	163
5.8.3	Herstellung von Purin-Mikroarrays auf Glas Slides	163
5.8.4	Einfluss von Blockierungspuffern	164
5.8.5	Bindungstests von Kinasen an der Purinbibliothek	164
6	Literaturverzeichnis	165

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut	GST	Glutathion-S-Transferase
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation	HEMA	2-Hydroxyethyl- methacrylat
[BMIM]OAc	1-Butyl-3-methyl- imidazoliumacetat	HOAc	Essigsäure
[BMIM]PF ₆	1-Butyl-3-methyl- imidazolium- hexafluorophosphat	HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
(Bu ₄ N)BF ₄	Tetrabutylammonium- tetrafluoroborat	HPLC	high pressure liquid chromatography
Bu ₄ NI	Tetrabutylammonium-iodid	HSbF ₆	Fluorantimonsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	Hyp	Hydroxyprolin
AS	Aminosäure	JA	Jeffamin
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl	Kap.	Kapitel
BPB	Bromphenolblau	K _d	Dissoziationskonstante
BSA	bovines Serumalbumin	LCM	Laser Capture Microdissection
CBS	Citrat gepufferte Salzlösung	LC/MS	Flüssigkeitschromato- graphie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Cmpi	4-Carboxymethyl-piperazin	mAk	monoklonaler Antikörper
CnC	Träger in Cut and Combine Synthese	MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
Cptd	3-Carboxymethyl- 1-phenyl-1,3,8-triazaspiro [4.5]decan-4-on	MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
CsCO ₃	Cäsiumcarbonat	Melm	Methylimidazol
Cy3/Cy5	Cyanin 3 bzw. 5	MeLeuN-Methyl-leucin	
DCM	Dichlormethan	MePhe	N-Methyl-phenylalanin
dH ₂ O	deionisiertes Wasser	MeOH	Methanol
DIAD	Azodicarbonsäure- diisopropylester	MTBE	Methyl-tert.-butylether
DIC	Diisopropylcarbodiimid	MTP	Mikrotiterplatte
DIPEA	Diisopropylethylamin	NaOH	Natriumhydroxid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin	NHS	N-Hydroxysuccinimid
DMF	Dimethylformamid	NMMO	N-Methylmorpholin- N-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid	NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
EELS	electron energy loss spectroscopy	PE	Polyethylen
ELISA	Enzym gekoppelter Immunosorbent Assay	PEG	Polyethylenglycol
ESI	electron spray ionisation	pdb	Protein Data Bank
EtOH	Ethanol	Pfp	Pentafluorophenol
ES	Träger in Einzelsynthese	Pip	Piperidin
Fa.	Firma	PipGly	N-(Boc-4-piperidyl)-glycin
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	PNA	Peptidnukleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	PP	Polypropylen
Fmoc	Fluorenylmethoxy-carbonyl	PurB	Purvalanol B
		Rink Linker	4-[(2,4-Dimethoxy-phenyl)- (aminomethyl)- phenoxyacetic acid
		RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur	Thiopro	Thioprolin
SC ²	spotting compound- support conjugate	TIBS	Triisobutylsilan
Sdp.	Siedepunkt	Tic	3-Carboxy-1,2,3,4-tetra- hydroisochinolin
SiO ₂	pyrogene Kieselsäure	TITK	Thüringisches Institut für Textil- und Kunststoff Forschung
SMM	Mikroarray kleiner organischer Moleküle	TOF	time of flight
Smp.	Schmelzpunkt	T-PBS	Tween 20 haltiges PBS
S _N Ar	nucleophile aromatische Substitution	Tpi	3-Carboxy-1,2,3,4- tetrahydronorharman
SP	Träger in SPOT-Synthese	TRITC	Tetramethylrhodamine- isothiocyanate
TBS	Tris gepufferte Salzlösung	T-TBS	Tween 20 haltiges TBS
tBu	tertiär Butyl-	ü. N.	über Nacht
TEM	Transmissions- Elektronenmikroskopie	UV	Ultraviolett
TFA	Trifluoressigsäure		
TFMSA	Trifluormethylsulfonsäure		

Für proteinogene Aminosäuren wird der übliche Ein- bzw. Dreibuchstabencode verwendet. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich dabei um L-Aminosäuren. Es werden die üblichen Einheiten, Symbole und Formelzeichen benutzt.

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Diagnostik

Medizinisch wissenschaftliche Fortschritte und auch technologische Neuerungen führen zu neuen Erkenntnissen über die komplexen Prozesse in biologischen Systemen. Dies erlaubt in der klinischen Anwendung eine effizientere Diagnostik, woraus sich neue Therapiemöglichkeiten ergeben können. Beispiele solcher Fortschritte sind die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, oder das stetig wachsende Feld der Bioinformatik, welches die Handhabung und Auswertung der anfallenden Datenmengen revolutioniert hat. Moderne Methoden der Genomik und Proteomik werden von akademischer und industrieller Seite immer gezielter für die Entdeckung von biologisch aktiven Substanzen genutzt. Diese sind unter anderem für die Anwendung in der klinischen Diagnostik von Interesse (1).

Der übliche Weg der medizinischen Diagnosefindung führt über Anamnese und körperliche Untersuchungen hin zu bildgebenden Verfahren, wie Computertomographie, Röntgen oder morphologischen Klassifizierungen von Bakterien unter dem Mikroskop. Dagegen findet bei der molekularen Diagnostik eine chemische Analyse molekularer Zusammenhänge statt. In Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben werden auf diesem Wege Biomoleküle als Indikatoren für den Krankheitszustand nachgewiesen. Diese Substanzen werden als Biomarker bezeichnet. Für deren Erkennung werden sogenannte Sondenmoleküle eingesetzt. Sonden binden selektiv an Biomarkermoleküle aus der zu untersuchenden Probe. In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probe und der Art einer möglichen Krankheit werden verschiedene Sondentypen eingesetzt.

1.1.1 Nukleinsäuren als diagnostische Sondenmoleküle

Sind zwei Nukleinsäurestränge zueinander komplementär, so tritt bei einer molekularen Wechselwirkung eine Verbindung zum doppelsträngigen Molekül ein. Diese Möglichkeit der Hybridisierung wird als hochselektive diagnostische Methode genutzt. Einzelsträngige Nukleinsäuren werden als Biomarker in Patientenproben über komplementäre DNA- oder RNA-Sonden erkannt. Beispielsweise können mittels Real Time PCR entsprechende Moleküle aus Blutseren oder Vollblut enzymatisch vervielfältigt und dabei qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Methode werden pharmakogenetische Untersuchungen durchgeführt (2). Hybridisierungstests werden hier für die Diagnostik von SNPs (single nucleotide polymorphisms) eingesetzt. Diese Variationen von einzelnen

Basenpaaren in Genen verschiedener Individuen und Populationen begründen bestimmte variierende Anfälligkeiten gegenüber Krankheiten oder ein individuell unterschiedliches Ansprechen auf Pharmaka (3). Ein anderes Beispiel stellt die FISH Methode dar. Hier werden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden verwendet. Als Probe kann ein einfacher Abstrich dienen (4). Sind in der Probe komplementäre Moleküle vorhanden, werden diese zur Hybridisierung gebracht und über ein Fluoreszenzmikroskop detektiert. In der Krebsdiagnostik werden so Chromosomenanalysen mit Hilfe markierter Sonden durchgeführt (5). Auch Nachweise von genetischen Erkrankungen erfolgen mit Hilfe der FISH Technik (4). Für den Direktnachweis bestimmter Bakterien wird die Detektion von ribosomaler RNA (rRNA) an lysierten Zellen vorgenommen. Hier erfolgt die Hybridisierung zwischen der rRNA und den einzelsträngigen DNA-Sonden (6). Die Erregerdiagnostik durch Gensonden führt innerhalb von einigen Stunden zur Identifizierung bestimmter Mikroorganismen (7), während bei klassischen Kultivierungsmethoden im Durchschnitt 48 h vergehen, bis dem behandelnden Arzt die gewünschte Diagnose vorliegt (4).

Als strukturell ähnliche Sonden werden auch PNA Moleküle (Peptid-Nukleinsäuren) bezüglich der FISH Methode verwendet. Diese synthetischen Substanzen besitzen im Gegensatz zum negativ geladenen Zucker-Phosphatgerüst von DNA und RNA ein neutrales peptidartiges Gerüst. Auch hier liegen die entsprechenden Basenpaare aneinandergereiht vor. Hybridisierungsreaktionen mit komplementären Nukleinsäuresträngen finden analog statt. Vorteile in der Anwendung von PNA liegen in einer erhöhten Schmelztemperatur und der Stabilität gegenüber Nukleinsäure abbauenden Enzymen, den Nukleasen. Mit Hilfe der PNA FISH Technik können so Speziesidentifikationen in klinischen Proben durchgeführt werden (8).

1.1.2 Proteine als diagnostische Sondenmoleküle

Proteine sind makromolekulare Polypeptide. Auf Grund ihrer dreidimensionalen Struktur können sie Wechselwirkungen mit diversen Molekülen eingehen, wie bei Antigen-Antikörper (9), Enzym-Substrat, Rezeptor-Protein oder ganz allgemein Protein-Protein Interaktionen (10). Kleine Moleküle können als Liganden, Inhibitoren oder Substrate an Proteine binden (11). Eine spezielle Klasse von Proteinen sind die Antikörper. Antikörper werden als sehr vielseitige Sonden in der Diagnostik in sogenannten Immunoassays mit seinen vielseitigen Varianten verwendet. Diese Antikörper binden spezifisch antigene Substanzen, gegen die sie durch *in vivo* Immunisierung oder durch *in vitro* Selektion (*phage display*) erzeugt worden sind. So können Erreger indirekt über deren antigene Zellstrukturen nachgewiesen

werden (7). Analog erfolgt die Verlaufsbeobachtung von Prostatakrebs über die immunologische Bestimmung des Prostata spezifischen Antigens PSA (12).

Eine Form von Immunoassays ist die ELISA Technik (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) (Abbildung 1). Diese Methode wird allgemein benutzt, um Antigene oder Antikörper in einer Probe nachzuweisen. Soll ein Antikörper detektiert werden, wird das entsprechende Antigen an eine feste Oberfläche immobilisiert und bindet den Antikörper der Probenlösung. Soll dagegen ein Antigen nachgewiesen werden, wird ein Antikörper an die feste Phase immobilisiert, der in einer zugegebenen Lösung die antigene Struktur bindet. In beiden Fällen werden die besetzten Bindungsstellen durch einen enzymmarkierten (Zweit-) Antikörper erkannt und über eine Farbreaktion quantitativ sichtbar gemacht (7). Mit Hilfe dieser Technik erfolgt die Bestimmung der Stämme von Grippeviren (13) oder auch der toxikologische Nachweis von Amanitin bei Vergiftungen durch den grünen Knollenblätterpilz (14)

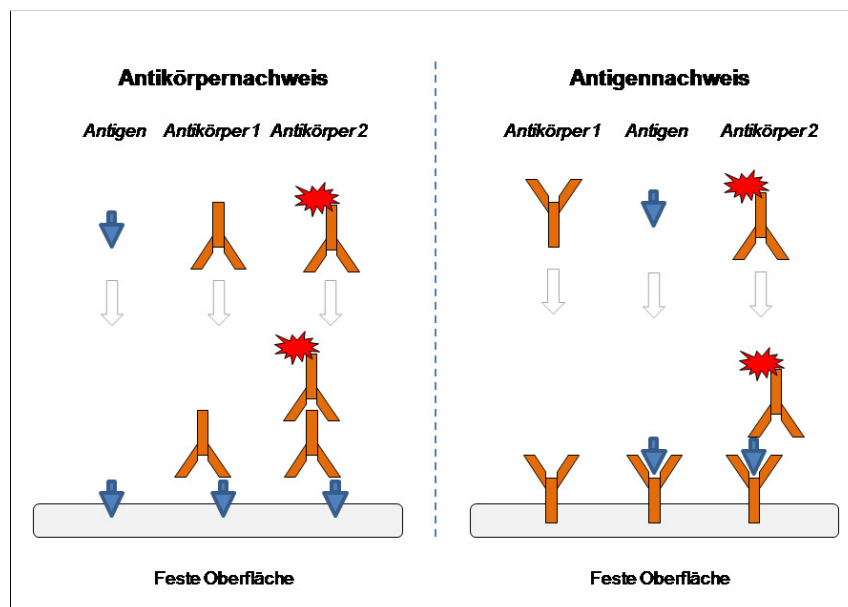


Abbildung 1: Varianten der ELISA-Technik zum Nachweis von Antikörpern (links) bzw. Antigenen (rechts)

1.1.3 Peptide als diagnostische Sondenmoleküle

Peptide sind analog zu Proteinen aus Aminosäuren aufgebaut. Während man ab etwa 100 Aminosäuren von Proteinen spricht, liegen die Kettenlängen bei den Peptiden jedoch i. d. R. bei weit unter 100 Aminosäuren. Bei diesen „kleinen Proteinen“ können sich deshalb prinzipiell ähnliche molekulare Interaktionen zu anderen Molekülen ergeben. Diese hängen im Wesentlichen von der Aminosäuresequenz ab. In der Diagnostik werden Peptidsonden besonders zur Detektion von Antikörpern verwendet. Korpereigene Antikörper werden als Immunantwort gegen Antigene gebildet. Die Antikörper können im Blutserum über

Peptidsonden nachgewiesen werden. Diese Methode der Diagnostik findet besonders dann Verwendung, wenn ein direkter Erregernachweis oder eine Kultivierung schwierig durchführbar sind (7). Auch die Diagnose von Autoimmunerkrankungen erfolgt über antigene Sonden. Beispielsweise werden bei rheumatoider Arthritis Autoantikörper gebildet, welche für die Krankheitssymptome verantwortlich sind. Diese Biomarker binden im Körper z. B. an bestimmte citrullinierte Proteine. Deren Epitope können durch entsprechende synthetische Peptidsonden imitiert werden. Über eine Bindung zu diesen Sonden werden dann die Autoantikörper detektiert (15).

Üblich für serologische Antikörperrnachweise ist die Verwendung der oben erläuterten (Kap. 1.1.2) ELISA-Technik. Die antigenen Peptidsonden werden an einer Oberfläche immobilisiert, um Antikörper aus der hinzugegebenen Probenlösung nachzuweisen (7).

1.2 Mikroarrays

In der gegenwärtigen molekularen Diagnostik wird eine Patientenprobe primär auf einzelne Analyten getestet, wie bei dem Nachweis eines einzelnen Gens oder Proteins (4; 16). Ein Großteil krankheitsrelevanter Prozesse ist jedoch von mehreren Faktoren abhängig, so dass z. B. Expressionen vieler Gene oder Proteine auf einmal untersucht und ausgewertet werden sollten. Weitere momentane Nachteile sind ein hoher Arbeits- und Zeitaufwand für Diagnosen, die sich bei serologischen Techniken oder der Kultivierung von Erregern ergeben. Für üblicherweise per ELISA durchgeführte Immunoassays werden vergleichsweise hohe Mengen sowohl von Reagenzien, als auch vom Probenmaterial benötigt (17; 18).

In der molekularen Diagnostik der zweiten Generation werden diese Nachteile umgangen. Automatisierung und die simultane Analyse einer großen Anzahl von Biomarkern führen zu einer schnelleren und umfangreicheren Diagnostik. Zusätzlich erlaubt eine zunehmende Miniaturisierung ein kostengünstigeres Arbeiten. Diese Kriterien erfüllen sogenannte Mikroarrays, auch Chips oder Biochips genannt. Sie sind dem häufig in Mikrotiterplatten durchgeführten ELISA vom Aufbau her ähnlich, allerdings hochminiaturisiert. Auf den Chips werden deutlich mehr Proben geringeren Volumens simultan getestet, wobei auch die benötigten Mengen an Reagenzien niedriger ausfallen.

Mikroarrays bestehen per Definition aus einer kleinen (planaren) Oberfläche mit einer darauf hochdicht gepackten, regelmäßig angeordneten Vielzahl von Sondenmolekülen. Die Größe der Oberfläche reicht von Objektträger großen Flächen bis zu wenige Millimeter großen Trägern (19). Verwendungsziel ist die vereinfachte und schnelle Untersuchung der Wechselwirkungen der Sonden mit biologischen

Proben sehr kleinen Volumens. Nachdem die zu untersuchende Probe auf den Chip gegeben wurde, können mögliche Bindungen zu Sondenmolekülen detektiert werden, beispielsweise über eine vorherige Fluoreszenzmarkierung der Probensubstanzen (19). Ein hoher potenzieller Nutzen solcher Biochips findet sich neben der medizinischen Diagnostik in der Chemischen Biologie und der Umwelt- oder Nahrungsmittelanalytik. Der oben genannten Definition entspricht eine Fülle von Mikroarray-Formaten. Diese unterscheiden sich in der Art der Oberfläche, dem Sondentyp, deren Auftragung und Immobilisierung, sowie der Möglichkeit der *in situ* Synthese direkt auf dem Träger (20; 19).

1.2.1 Mikroarrays auf Biomolekülbasis

1.2.1.1 Nucleinsäurebasierte Mikroarrays

Nukleinsäuren auf DNA- oder RNA-Chips können zur beschleunigten Untersuchung vieler genetischer Veränderungen benutzt werden, wie sie bei Krebs, Diabetes oder Schizophrenie (10) vorkommen. Im Gegensatz zu Methoden wie der FISH-Technik, können mit Hilfe von Nukleinsäure-Chips viele Gensonden gleichzeitig untersucht werden.

Die Arbeit von AUGENLICHT et al. (21) im Jahre 1987 kann als erste Veröffentlichung zum Thema Mikroarrays angesehen werden. Über die Quantifizierung von Genexpressionsprofilen konnten genotypische Vergleiche von Gewebeproben durchgeführt werden. Darmkrebskarzinom, gutartiges Tumorgewebe und niedriggefährdete Darmschleimhaut wurden untersucht. Als Sonden sind cDNA Moleküle eingesetzt worden. Durch die Klonierung von cDNA aus einer humanen Darmkrebszelllinie (HT-29) in E.Coli konnten 4032 Klone produziert werden (*Abbildung 2, links*). Daraus wurden entsprechend 4032 cDNA Sonden erhalten. Diese Sondenbibliothek ist auf 42 Stück 96er Mikrotiterplatten aufgeteilt worden. Über einen Replicastempel wurden diese Sonden auf Nitrocellulose als Oberfläche erstmalig in einer regelmäßigen Anordnung aufgetragen. Aus den zu untersuchenden Biopsieproben wurde ebenfalls cDNA gewonnen und diese zusätzlich radioaktiv markiert. Die cDNA ist auf die Membran gegeben worden, um dort mit möglichen komplementären Sonden zu hybridisieren. Über die Belichtung eines Fotofilms (*Abbildung 2, rechts*) konnten so die Veränderungen der Genexpression bei Darmkrebs aufgezeigt werden (21).

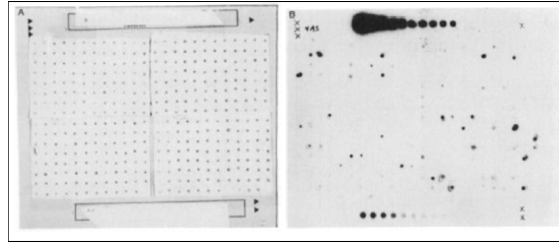


Abbildung 2: links: Teil von Bakterienkolonien; rechts: Autoradiograph nach Hybridisierungsreaktion (21)

Eine erste Beschreibung zur Synthese von Oligonucleotiden auf Glasträgern lieferte 1989 E. SOUTHERN. In dem Patent wird die Kopplung des ersten Nucleotids und die folgende Oligomersynthese mit Hilfe von Schutzgruppenchemie dargestellt (22).

1991 entwickelten FODOR et al. (23; 24) eine photolithographische Methode zur Herstellung von hochdichten Chips auf einer Glasoberfläche. Abhängig vom Muster eingesetzter Masken werden nur adressierte Positionen auf der Oberfläche photochemisch entschützt. Dort kann die schrittweise *in situ* Synthese von oligomeren Sonden (Peptide, Oligonucleotide) ortsspezifisch durchgeführt werden, so dass auf scharf abgegrenzten Arealen definierte Sequenzen synthetisiert werden (bezüglich kombinatorischer Synthese s. Kap. 1.3.1). Mit dieser Methode konnten u. a. 1024 verschiedene Peptide auf separaten Positionen von je 400 µm x 400 µm Fläche hergestellt werden. Über einen monoklonalen Probenantikörper wurden anschließend bekannte Epitope gebunden. Die besetzten Bindungsstellen sind mit einem fluorophormarkierten Zweit-Antikörper detektiert worden. Die Technik wurde analog zur Synthese und Detektion von Oligonucleotiden weiterentwickelt. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht neben der ortsspezifischen Synthese in der hohen Miniaturisierung, die prinzipiell nur durch die Lichtbeugung begrenzt ist. Da hier die Nucleotidsynthese *in situ* stattfindet, ergeben sich jedoch Probleme bei der Reinheit. Selbst bei Ausbeuten von 95 % pro Kopplungsschritt ergeben sich für ein Oligomer von 25 Bausteinen nur 33 % Produktausbeute. Mit diesem Verfahren werden die heute kommerziell vertriebenen GeneChips® von Affymetrix hergestellt (www.affymetrix.com; Santa Clara, USA). Ausgehend von einem 5"x 5" Quartz Wafer werden Chips mit über 1 Mio. Sonden generiert, welche in der Regel aus 25 Nucleotiden bestehen. Das Problem der geringen Ausbeute soll mit einer großen Anzahl von sich überlappenden Sequenzen ausgeglichen werden. Ein zusätzlicher Aufwand ist bei dieser Methode die Anzahl der individuell benötigten Masken. Für die Herstellung von Oligonucleotiden aus N Bausteinen werden 4 x N verschiedene Masken benötigt. Für Peptide wären es entsprechend sogar 20 x N. Dies führt zu hohen Kosten und einem hohen zeitlichen Aufwand (25).

Anstatt mit photolithographischen Masken können adressierte Areale auf der Oberfläche auch mit Mikrospiegeln für die ortsspezifische, kombinatorische Synthese

(vgl. Kap. 1.3.1) zugänglich gemacht werden. SINGH-GASSON et al. (26) entwickelten 600 x 800 individuell steuerbare Spiegel á 16 µm x 16 µm Fläche, mit deren Hilfe die gewünschten Positionen für die Nucleotidsynthese photochemisch entschützt werden. Auf 10 mm x 14 mm können so theoretisch 480.000 Positionen adressiert werden. Bei einer Ausbeute von 95 % pro Kopplungsschritt sind so u.a. 160 Sonden (à 16 µm²) von 18 Nucleotiden Länge synthetisiert worden. Ziel des Experimentes war, die Abhängigkeit der Hybridisierung von der Sequenzübereinstimmung aufzuzeigen. Dazu sind die Sonden in jeder ersten von vier Reihen des Chips (*Abbildung 3*) als die Sequenz des Gens *CDK6* aus *Arabidopsis thaliana* synthetisiert worden.

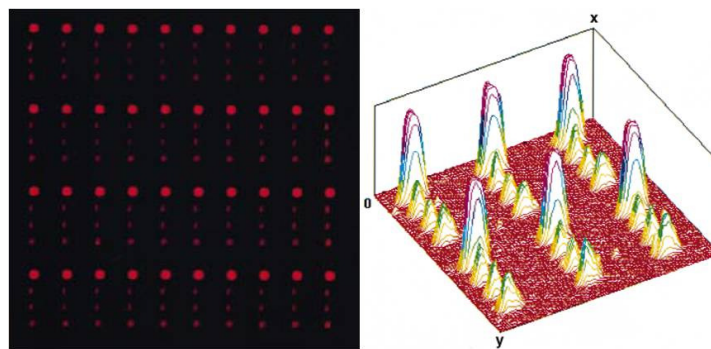


Abbildung 3: links: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Hybridisierungsspezifität; rechts: dreidimensionale Darstellung derselben Signalintensität; entnommen aus (26)

Die Sequenzen in jeder nächsten Zeile beinhalten eine, bzw. zwei bzw. drei nicht komplementäre Basen innerhalb der Sequenz, wodurch die Bindung zunehmend geschwächt wird. Für die Hybridisierung an den Sonden sind biotinylierte Zielsequenzen eingesetzt worden. Über die bekannte Bindung von Biotin zu Streptavidin wird durch eine anschließende Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin die Hybridisierung detektiert. Auf dieser Technologie basierend vertreibt heute Nimblegen (www.nimblegen.com; Madison, USA) DNA-Chips. Bis zu 2,1 Mio. separat positionierte Nucleotidsonden werden auf einem Chip mit Hilfe von Aluminiumspiegeln erzeugt. Wie bei der Herstellung über lithographische Masken stellt auch hier auf Grund der in situ Synthese die geringe Ausbeute der Zielsequenzen einen Nachteil dar.

Ein Mikroarray Format, dass auf optischen Biosensoren beruht, wurde in den Neunzigerjahren in der Arbeitsgruppe von WALT entwickelt (27). Der heutige Einsatz dieser Technik erfolgt für die kommerzielle Herstellung von DNA-Chips, den sogenannten BeadArrays[®] (s. u.). Das Trägermaterial für die Sonden besteht aus kleinen Kügelchen (*beads*), die auf einem Bündel von Glasfasern aufgebracht werden. Dazu werden kommerziell erhältliche Glasfasern mit einem Kunststoff hexagonal zu Bündeln verschmolzen. 20.600 Fasern mit einem Durchmesser von

3,6 μm ergeben ein Bündel von 1000 μm Breite. Die Glasoberfläche wird mit einem Flusssäuregemisch angeätzt, wobei das Mantelmaterial unbeschädigt erhalten bleibt. Dadurch bilden sich Vertiefungen (*Microwells*) von 36 Femtolitern Volumen (*Abbildung 4, a*). Die eingesetzten Sonden werden auf Kunststoffkügelchen von 3,1 μm Durchmesser gekoppelt. Eine Suspension der Kugeln wird auf die Glasfaseroberfläche gegeben. Durch Verdampfen des Lösemittels ordnet sich je eine Kugel in einer Vertiefung an und verbleibt dort (*Abbildung 4, b*). Die Besetzung der Microwells erfolgt zu etwa 96 % (*Abbildung 4, c*). Eine durch Bindung zu den Sonden erhaltene Fluoreszenz einer jeden Kugel (*Abbildung 4, d*) kann direkt über die anliegende Glasfaser weitergeleitet und ausgelesen werden.

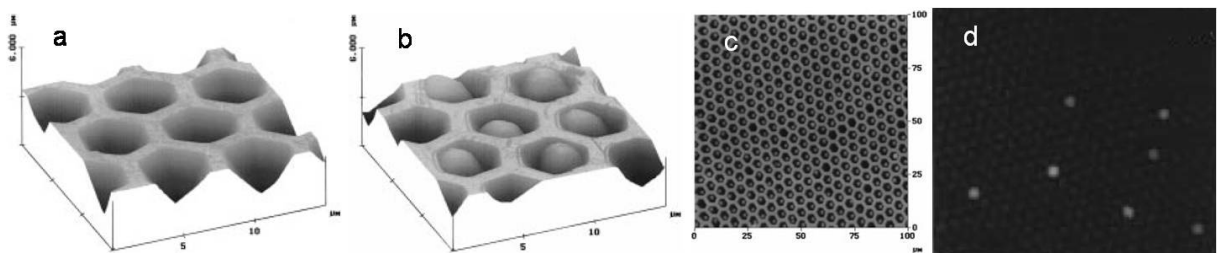


Abbildung 4: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen, a: eingätzte Glasfasern, b: Vertiefungen gefüllt mit Kügelchen, c: 96 % Besetzung, d: Detektion von Sonden; entnommen aus (27)

Die Firma Illumina entwickelt auf diese Weise Nukleinsäure-Chips, die sogenannten BeadArrays[®] (www.illumina.com, San Diego, USA). Die Herstellung der Chips erfolgt hier weiterhin auf Glasfasern oder alternativ auf planaren Silicaträgern. Die Oligonucleotide werden kombinatorisch synthetisiert (vgl. Kap. 1.3.1). Über das Intensitätsverhältnis zweier zusätzlich gebundener Farbstoffe erfolgt die Zuordnung einer Kugel zu den darauf befindlichen Sonden. Der zufällige Ort der Kugel auf dem Faserbündel ist somit bedeutungslos. Vorteile dieses optischen Sensor Arrays sind die günstige und einfache Herstellung. Vielschrittige Vorgänge sind nicht nötig. Eine Codierung über verschiedene Farbstoffe und die anschließende Zuordnung erfordern jedoch gerade bei hohen Sondenzahlen einen besonderen Aufwand.

Einen großen Einfluss auf die Mikroarray Forschung hat eine 1995 von SCHENA et al. (28) entwickelte Methode ausgeübt. Diese stellt im Prinzip eine Miniaturisierung der Technik von Augenlicht et al. (21) dar (s. o.). Bei der Methode werden zum ersten Mal die Sonden über ein sogenanntes Kontaktdruckverfahren per Spotnadel auf Glasträger aufgebracht (*gespottet*). Das Verfahren ist in anderen Laboren vergleichsweise leicht zu reproduzierenden und wird heute somit häufig für Peptid-Chips oder Mikroarrays auf Basis kleiner organischer Moleküle (29) verwendet. Mit Hilfe dieser Technik konnte SCHENA die Überexpression eines einzelnen Gens bei einer transgenen Pflanze gegenüber dem Wildtyp

1. Einleitung und Aufgabenstellung

nachweisen (*Abbildung 5*). Dazu wurden aus dem jeweiligen Transkriptom 45 verschiedene cDNA Sequenzen von etwa 1000 Basenpaaren Länge erzeugt, welche als Sonden durch einen speziell angefertigten Roboter auf funktionalisierte Glasobjektträger gespottet worden sind. Als Proben sind fluoreszenzmarkierte cDNA Moleküle aus dem gesamten Transkriptom der Pflanze hergestellt und für die Erzeugung eines Genexpressionsmusters eingesetzt worden.

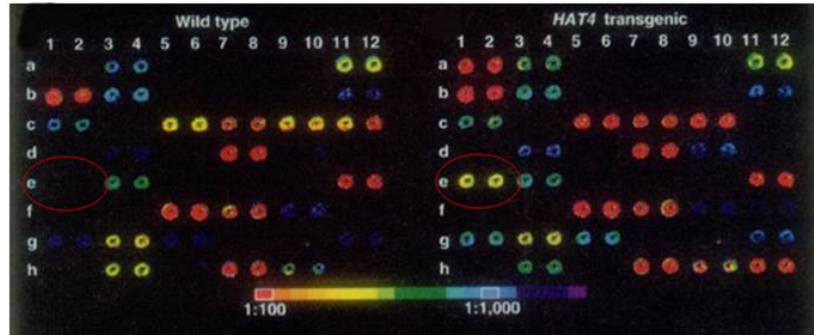


Abbildung 5: Genexpressionsprofil aus Arabidopsis Thaliana. links: Wild Typ, rechts: HAT4 transgene Pflanze; entnommen aus (28)

Pro Kontakt werden etwa 5 nl Sondenmaterial abgegeben, was zu einem Spot-Durchmesser von nur 500 μm führt. Auf einem Glasobjektträger können so 20.000 Spots aufgetragen werden. Durch die Verwendung von Hochpräzisionsrobotern und speziellen Spotnadeln (*Abbildung 6*) können heute Spotdurchmesser von etwa 50 μm Durchmesser erreicht werden (11). Ein bis heute vorhandener Nachteil dieser einfach durchzuführenden Methode ist die nicht optimale Reproduzierbarkeit. Besonders die Übertragungszuverlässigkeit bezüglich Spotgröße, Position und Form ist hier nicht zufriedenstellend.

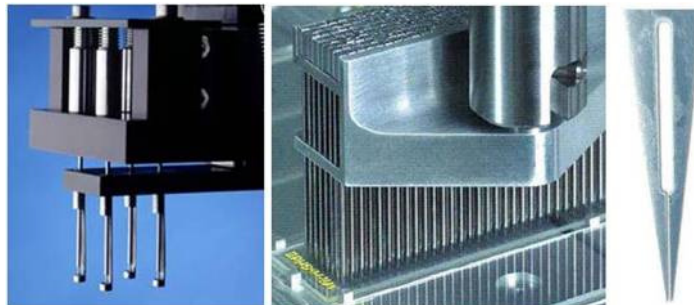


Abbildung 6: Druckköpfe für Kontaktdruckverfahren, links: Ring und Pin System, rechts: Split Pin System

Die Mikroarray-Entwicklung ist am weitesten im Bereich der Nukleinsäure-Chips fortgeschritten, da hier ein einheitliches Prinzip der Sonden-Analyt Erkennung und der Immobilisierung der Sonden gegeben ist. Entsprechend stellen die DNA-Chips heute einen Großteil der kommerziell hergestellten Mikroarrays dar (19).

1.2.1.2 Proteinbasierte Mikroarrays

Prinzipiell können an Stelle von Untersuchungen auf Genombasis auch Untersuchungen auf der Ebene des aus den Genen exprimierten Proteoms durchgeführt werden. Interaktionen mit Proteinen als Sonden bieten die Möglichkeit zu noch genaueren Informationen, da biologische Funktionen meist durch Proteine vermittelt werden. Der Einsatz von Protein-Chips ermöglicht diverse Typen von Bindungsuntersuchungen, wie Antigen-Antikörper (9), Enzym-Substrat, Rezeptor-Protein oder ganz allgemein Protein-Protein Interaktionen (10) an vielen Sonden parallel. Für die Etablierung von Protein Chips ergeben sich bisher jedoch technische Schwierigkeiten, wie die Gewährleistung der korrekten dreidimensionalen Proteinstruktur und der Erhalt der Aktivität nach der Immobilisierung (30).

Durch das Spotten auf Glasobjektträger entwickelten MACBEATH und SCHREIBER 2000 einen der ersten Protein-Mikroarrays (31). Mit dieser Methode konnten sie eine Dichte von 1600 Sonden/cm² erhalten. Für eine Immobilisierung ist die kovalente Kopplung an eine BSA-Monoschicht gewählt worden. Diese Schicht sollte eine freie Beweglichkeit und Zugänglichkeit der Sonden ermöglichen. Zuerst wird das Protein BSA an die Objektträger gebunden und in eine aktivierte, NHS Gruppen haltige Form überführt. Mit diesen Gruppen gehen die aufgetragenen Proteine über ihre Aminogruppen kovalente Bindungen ein. Die Proteine werden in einer glycerolhaltigen Lösung gespottet, um eine Austrocknung und somit Denaturierung zu vermeiden. Als Probensubstanzen sind sowohl kleine organische Moleküle, Proteine als auch die Substrate einer Proteinkinase getestet worden. Unter anderem konnte so die erhaltene Aktivität der Sonden auf der Oberfläche belegt werden.

PAWELETZ et al. haben 2001 den Reverse Phase-Protein Array (RPPA) entworfen (32; 33). Hier werden nicht die Spots einzelner Proteine erzeugt. Jeder Spot enthält stattdessen das gesamte Repertoire an Patientenproteinen eines bestimmten Gewebeausschnittes. Pro Spot wird also ein komplettes Zelllysate immobilisiert. Während bei Antikörper-Arrays das Zelllysate als Probelösung untersucht wird, werden die Lysatproteine auf dem RPPA als Sonden präsentiert. Eine Markierung zellulärer Proteine entfällt damit. Für die Herstellung wird zuerst die betreffende Gewebeprobe mit Hilfe einer histopathologischen Technik (*laser capture microdissection*, LCM) separiert (*Abbildung 7*). Die relevanten Zellpopulationen können so selektiert und lysiert werden. Über einen Pin basierten Spot-Roboter

werden die Proben auf einem mit Nitrocellulose beschichteten Glas-Slide abgelegt. Der resultierende Spottedurchmesser liegt im Bereich von 250-350 μm . Die Detektion und Quantifizierung vorhandener Proteine erfolgt anschließend durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern der Wahl. In der Anwendung konnten die Autoren mit Hilfe des RPPA gegenüber Normalgewebe eine verstärkte Phosphorylierung zweier Kinasen in Prostata-Biopsieproben nachweisen.

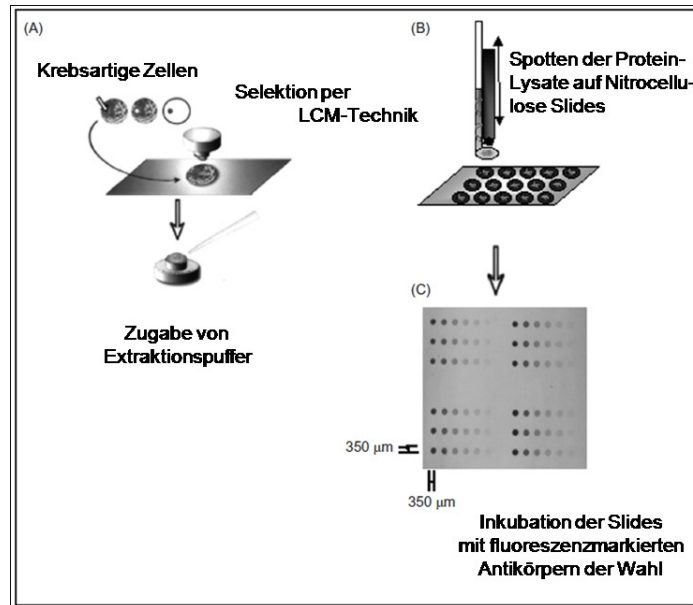


Abbildung 7: Schema der Herstellung eines Reverse Phase Protein-Arrays (RPPA) ; entnommen aus (33) und verändert

Ein Verfahren, bei dem die Proteine erst direkt auf der Oberfläche exprimiert werden, entwickelten 2001 HE et al. (34; 35). Für die Herstellung des sogenannten „Protein *in situ* Array“ (PISA) müssen zuerst die entsprechenden Gene per PCR amplifiziert und anschließend auf die Oberfläche aufgetragen werden. Bei der Vervielfältigung werden der DNA die für eine Expression essentiellen Elemente (T7 Promotor, Translationsinitiationsregion) hinzugefügt. Außerdem schließt sich eine Sequenz (*tag*) für die Immobilisierung des zu erstellenden Proteins an. Die Gene werden separat aufgetragen und mit einem *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem versehen (*hier*: Retikulozytenlysate aus Kaninchen). Darin erfolgt die zellfreie Expression der Proteine, welche über ihre *tag*-Sequenz *in situ* an die feste Phase immobilisiert werden. Als Oberfläche sind hier funktionalisierte Mikrotiterplatten und Agarosekügelchen untersucht worden. Mit dieser Methode sollen Probleme wie Unlöslichkeit und Degradation bei der bakteriellen Expression rekombinanter Proteine umgangen werden. Die Aktivität auf diesem Wege erzeugter Sonden konnte an Hand humaner, einzelsträngiger Antikörperfragmente und dem Enzym Luciferase gezeigt werden. Auf Basis dieser Entwicklung wird heute der DiscernArray™ der Firma Discerna Protein Solutions vertrieben (www.discerna.co.uk, Cambridge, UK).

Weitere kommerzielle Anbieter von Protein-Chips sind Whatman plc (www.whatman.com, Madstone, UK) oder Sigma Aldrich (www.sigmaaldrich.com, St. Louis, USA). In beiden Fällen werden Antikörper auf Glasobjektträgern bereitgestellt. Whatman bietet zusätzlich die individuelle Herstellung von Chips mit Proteinen des Anwenders an.

1.2.1.3 Peptidbasierte Mikroarrays

Als Sonden können Peptide zur Detektion von Proteinen benutzt werden. Beispiele sind Antigen-Arrays zum Nachweis von Antikörpern in Blutseren (17) oder Peptid-Arrays zur genauen Charakterisierung von Bindungsstellen (*epitope mapping*) über einen sogenannten Peptid Scan (36).

Nachdem FODOR et al. 1991 (23) die Herstellung von DNA- und Peptid-Chips über eine photolithographische Methode zeigten (*Kap. 1.2.1.1*), entwickelten PELLOIS et al. 2002 eine alternative Methode (37) zur direktsynthetischen Herstellung von Peptid-Arrays. Die Oberfläche eines Mikrochips wird dabei so funktionalisiert, dass Boc geschützte Aminogruppen gebunden vorliegen. Auf der Fläche wird der Vorläufer einer photokatalytisch generierbaren Säure verteilt. Über individuelle Lichtprojektionen wird nun ortsspezifisch die Säure (HSbF_6) freigesetzt. Dadurch wird an den entsprechenden Positionen die säurelabile Boc-Schutzgruppe abgespalten und freie Aminogruppen werden erzeugt. Daran findet die anschließende Kopplung einer weiteren Boc geschützten Aminosäure statt. Auf diese Weise sind Chips mit *in situ* synthetisierten Decapeptiden von einer Dichte von tausenden Sondenarealen/ cm^2 hergestellt worden. Die spezifische Erkennung bestimmter Sequenzen konnte anschließend über ein durchgeführtes *epitope mapping* belegt werden. Trotz Produktausbeuten von > 98 % pro Teilschritt zeigt sich auch bei dieser Methode die mit wachsender Kettenlänge abnehmende Reinheit der Endsequenz als nachteilig.

REIMER et al. stellten 2002 Peptid-Chips durch die Immobilisierung zuvor synthetisierter Peptide her (38). Mit Hilfe eines Spot-Roboters sind bis zu 720 verschiedene dieser Sonden in jeweils drei Kopien auf funktionalisierte Glasobjektträger aufgetragen und kovalent gebunden worden. Die Peptide sind abgeleitet von Phosphorylierungsstellen humaner Proteine. Nach einer Inkubation mit der Kinase c-Abl konnten phosphorylierte Peptide über einen fluoreszenzmarkierten Phosphotyrosin spezifischen Antikörper detektiert werden. Eine der Immobilisierung vorausgehende Synthese und Aufreinigung der einzelnen Peptide stellt jedoch einen zeit- und arbeitsintensiven Prozess dar.

Das Prinzip der ortsgerichteten Synthese wurde 1992 durch positionierte Verteilung von Reagenzien von FRANK (39) am Beispiel paralleler Peptidsynthese an planarer

Cellulosemembran gezeigt (vgl. Kap. 1.3.1). Daraus ist die Herstellung hochdichter Mikroarrays cellulosegebundener Peptide (Kap. 1.3.2) hervorgegangen (40). Auf diese Weise auf Glaträgern erzeugte Peptid-Chips werden von der Firma Intavis Bioanalytical Instruments unter dem Namen CelluSpots™ Peptide Arrays vertrieben (www.intavis.com, Köln, Deutschland).

Eine kürzliche Weiterentwicklung des Prinzips zu hochdichten Peptid Arrays stellten 2007 BEYER et al. vor (41). Bei einer Dichte von 40.000 Sonden pro cm² sind zwei verschiedene Peptide (8-Mere) schachbrettartig auf der Oberfläche synthetisiert und über entsprechende monoklonale Antikörper detektiert worden. Die Peptidsynthese findet *in situ* auf der Oberfläche statt (Abbildung 8). Dazu werden die einzelnen Fmoc geschützten Aminosäuren als Aktivester eingesetzt. Sie liegen zusammen mit festen Homologen von Lösemitteln und mit Stabilisatoren und Ladungsträgern im Gemisch als 4-8 µm große Partikel vor. In einem speziellen Gerät werden die Partikel in ein Aerosol überführt und aufgeladen. Anschließend werden sie über elektrische Felder durch kleine Elektroden (100 V) zu den gewünschten Positionen auf der Oberfläche geführt. Eine komplette Schicht an verteilten Aminosäuren wird an den entsprechenden Positionen gleichzeitig geschmolzen und so an die jeweilige Ausgangssequenz gekoppelt. Die Vorteile sind eine hohe Sondendichte und eine chemisch unabhängige Adressierung. Nachteilig ist auch bei dieser *in situ* Synthesetechnik die mit zunehmender Kettenlänge abnehmende Ausbeute der Zielsubstanz.

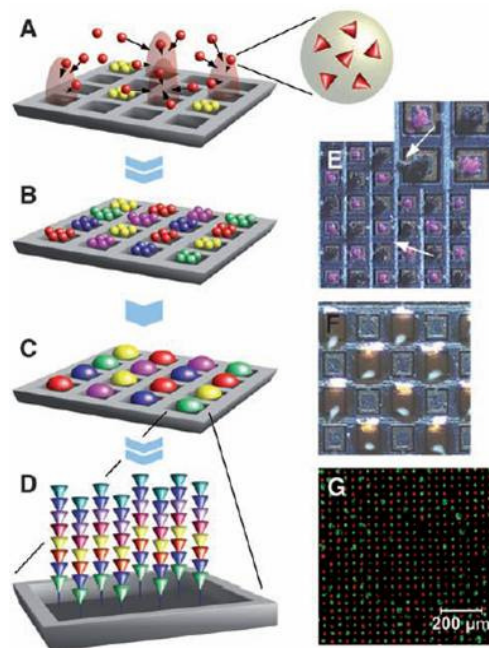


Abbildung 8: Partikelbasierte Synthese von Peptid Arrays. A: über Elektroden adressierte Aminosäurepartikel, B: vollständige Schicht adressierter Aminosäuren, C: gleichzeitiges Schmelzen und Koppeln, D: Sequenzverlängerung durch wiederholte Zyklen, E: Partikel auf den Arealen; Pfeile zeigen Falschbesetzungen, F: Beispiel überladener Areale, G: zwei über zwei mAk detektierte Peptidsonden; entnommen aus (41)

1.2.2 Mikroarrays auf Basis kleiner organischer Moleküle

Ein vergleichsweise neues Gebiet stellen die sogenannten *Small Molecule Microarrays* (SMMs) dar, bei denen die Sonden aus kleinen organischen Molekülen bestehen. Hierbei handelt es sich um niedermolekulare, nicht polymere Substanzen. Durch die Verwendung von SMMs, wird versucht, neue spezifische Bindungspartner für Proteine zu finden. Bisher sind auf diese Weise bereits verschiedene Binder für Proteine gefunden worden (11). Kleine organische Moleküle können dabei als Modulatoren für Proteine wirken und direkt zur Untersuchung der Funktionen in zellulären Prozessen beitragen. Weiterhin finden SMMs Anwendung in der Entdeckung und Optimierung von Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung, oder bei der Entdeckung von Biomarkern für die medizinische Diagnostik (42). Die Suche nach bioaktiven Molekülen stellt einen mehr oder weniger empirischen Prozess dar, deshalb werden möglichst große Substanzsammlungen, die Molekülbibliotheken untersucht. Die Erstellung solcher Bibliotheken wird entweder durch Isolation aus biologischen Quellen durchgeführt (43) oder durch die chemische Synthese.

Mikroarrays aus kleinen organischen Molekülen lassen sich über die Immobilisierung von Substanzbibliotheken auf kleinen planaren Oberflächen erzeugen. Während die Immobilisierung von strukturell einheitlichen Oligomeren (Peptiden, Nucleotiden) prinzipiell immer auf die gleiche Weise durchgeführt werden kann, ist eine kovalente Bindung von kleinen organischen Molekülen an eine Oberfläche immer auch von ihrem molekularen Aufbau abhängig.

Die erste Arbeit zum Thema SMMs stammt aus dem Jahre 1999 (29). Vier verschiedene kleine organische Sondenmoleküle konnten auf dem Chip zuverlässig über eine bekannte Bindung zu bestimmten Proteinen detektiert werden. Die Sonden wurden im Nanolitervolumen mittels der Spot Methode auf maleimid derivatisierte Glasobjektträger aufgetragen. Eine Immobilisierung der thiolhaltigen Substanzen auf dem Träger erfolgte dann über die Michael-Addition. Spotdurchmesser von 200-250 μm entsprechend >1000 Sonden/ cm^2 sind so erzeugt worden. Verschiedene Immobilisierungsmethoden wurden seitdem erforscht. Beispiele sind die Thiazolidin Ringbildung über Glyoxylylgruppen mit 1,2-Aminothiolen (44) oder 1,3-dipolare Cycloadditionen terminaler Alkine mit Aziden (45; 46). Nicht-kovalente Immobilisierungen an einer Oberfläche können dagegen über terminale Oligomerreste an den Sonden erreicht werden. Untersucht wurde der Einsatz von Perfluoralkyl- (47; 48; 49) oder Celluloseketten (40).

1.3 Die Generierung von Substanzbibliotheken

Die chemische Generierung einer Molekülbibliothek erfolgt mit Hilfe der kombinatorischen Chemie. Mit dieser Methode können viele Strukturen durch verschiedene Kombinationen mehrerer Edukte simultan hergestellt werden. Allein bei der Synthese eines Tripeptids aus den 20 proteinogenen Aminosäuren sind schon $20^3 = 8000$ verschiedene Substanzvariationen möglich (50). Obwohl auch kombinatorische Chemie in Lösung durchgeführt wird, findet die Hauptanwendung zur Erstellung von großen Substanzbibliotheken als Synthese an festem Trägermaterial statt, da die notwendige Automatisierung hier mit geringerem Aufwand betrieben werden kann. Weiterhin besteht die Möglichkeit, hohe Überschüsse einzusetzen, die durch einfaches Waschen der festen Phase wieder entfernt werden. Den Grundstein für die Festphasensynthese legte 1963 MERRIFIELD mit der Beschreibung der Peptidsynthese an Polystyrolharzen (51).

1.3.1 Methoden der kombinatorischen Festphasensynthese

Die kombinatorische Synthese an fester Phase lässt sich in zwei Kategorien unterteilen, die multiple Synthese und die Parallelsynthese. Bei der **multiplen Synthese** werden die Trägersegmente vor jedem Reaktionsschritt in verschiedene Reaktionsgefäße sortiert und nach Reaktion und Aufarbeitung wieder neu kombiniert. Beispiele sind die Filter Disc- (52) und die Teebeutel Methode (*tea bag*) (53). Eine spezielle Variante der simultanen multiplen Synthese ist die Cut & Combine Methode (54). Über diese Technik ist bisher die Herstellung einer Peptidbibliothek von 400 Substanzen durchgeführt worden. Als feste Phase wird membranförmige Cellulose verwendet. Die Ausgangsmembran wird für jeden Reaktionszyklus in kleinere Teile geschnitten, und diese mit verschiedenen Reaktanden umgesetzt. Anschließend werden alle Träger wieder kombiniert und auf andere Weise weiter separiert. So wird für jede Reaktionsstufe ein erneutes Schneiden und Kombinieren durchgeführt. Eine Zuordnung von Träger und Zielsubstanz ist jederzeit über eine vorherige schriftliche Codierung auf der Oberfläche möglich. Ein weiterer multipler Ansatz ist die „split-and-mix“ Methode (55). Die Synthese wird an Harzkügelchen (*beads*) als fester Phase durchgeführt. Vor jedem Reaktionsschritt werden die Trägerkugeln aufgeteilt (*Abbildung 9*) und anschließend wieder vereinigt und durchmischt. Nach Durchführung aller Schritte erhält man auf jedem Kügelchen genau eine Verbindung in vielfacher Kopie („one bead-one compound“) (56).

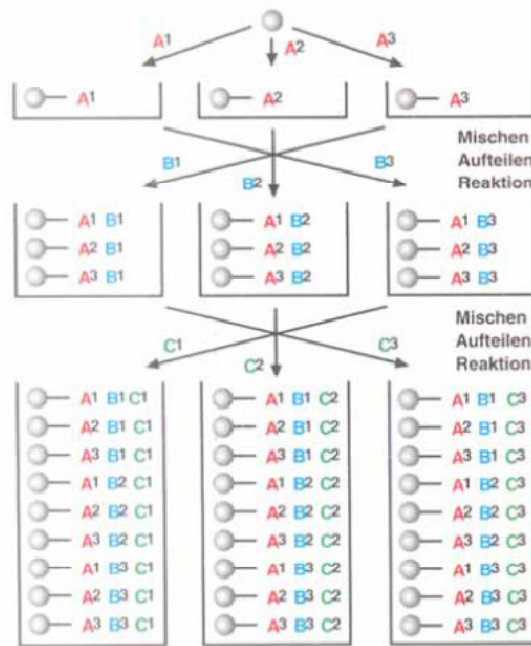


Abbildung 9: "Split and mix" Methode (50)

Um im Anschluss die Zuordnung eines Kügelchens zu seiner Zielsubstanz vornehmen zu können, werden zusätzlich codierende Substanzen auf jedem Träger synthetisiert. OHLMEYER et al. haben chemisch inerte Moleküle an die Beads gekoppelt, über die per Gaschromatographie eine eindeutige Zuordnung durchgeführt werden konnte (57). Eine andere Möglichkeit ist die Codierung durch zusätzliche Oligonucleotide, die als Erkennungssequenzen auf jedem Harzkügelchen dienen (58). Dabei ergeben sich jedoch ein doppelter Syntheseaufwand und die Möglichkeit zu Nebenreaktionen durch das codierende Molekül als nachteilig.

Wird in der kombinatorischen Chemie die Zuordnung der Zielsubstanz über eine feste örtliche Position vorgenommen, spricht man von **Parallelsynthese**. Bei der Pin Methode nach GEYSEN et al. (59) bilden Stäbchen als Träger diese festen Positionen. Die Pins werden in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten getaucht, in denen sich die Reaktionslösung befindet. Eine parallelsynthetische Methode für die Erstellung von Peptidbibliotheken auf planaren Oberflächen ist die 1992 von FRANK (39) entwickelte SPOT-Synthese. Diese findet heute ebenfalls Anwendung für die Generierung von Bibliotheken kleiner organischer Moleküle (60; 61). Die Reagenzien werden in einer matrixähnlichen Anordnung durch einen Roboter zielgenau auf eine funktionalisierte Cellulosemembran pipettiert (*gespottet*) (Abbildung 10, a). Die Vorteile von Cellulose als Oberfläche liegen in der hohen chemischen und mechanischen Stabilität, als auch in der porösen Struktur. Durch Absorption der Lösung bilden sich runde Flächen (*Spots*) aus, innerhalb derer die Reaktion stattfindet. Gespottet werden Volumina von einigen nl bis zu wenigen µl, wobei sich ein Spotdurchmesser im Millimeterbereich ergibt. Auf speziell funktionalisierter Cellulose werden so

Stoffmengen im Bereich von 1-5 nmol/mm² pro Spot synthetisiert. Bei der photolithographischen Synthese auf Glaträgern nach FODOR et al. (23) (vgl. Kap. 1.2.1.1) wird die örtliche Adressierung bei der Parallelsynthese über die eingesetzten Masken vorgenommen (Abbildung 10, b). Die erzielte scharfe Trennung von synthetisierten Sonden und nicht fluoreszierendem Hintergrund wird in Abbildung 10, c dargestellt. Bei der von SINGH-GASSON et al. entwickelten Methode werden entsprechende Areale über Mikrospiegel zugänglich gemacht (Kap. 1.2.1.1).

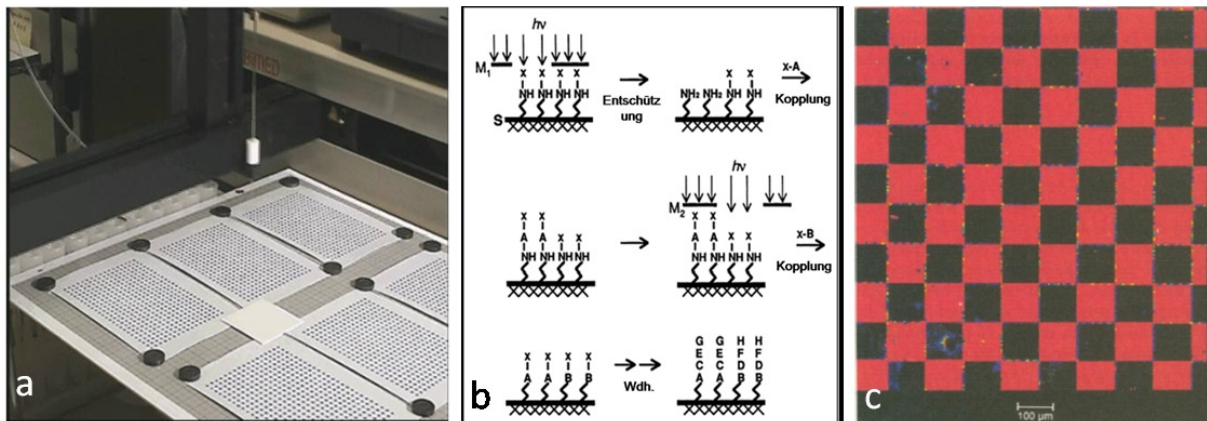


Abbildung 10: a: SPOT-Synthese (40); b: Darstellung photolithographischer Synthesecyklen, c: ortsspezifische Unterscheidung zwischen detektierter Sonde (rot) und Hintergrund auf dem Chip nach der photolithographischen Synthese (23)

1.3.2 Herstellung von Mikroarrays aus cellulosegebundenen Substanzen

Sowohl die Synthese nach SPOT-Bedingungen, als auch nach der Cut & Combine-Methode erfolgt auf planarer Cellulose als Oberfläche. Hier kann eine anschließende Auflösung der Celluloseträger mit den daran gebundenen Substanzen durchgeführt werden. Dazu wird eine speziell entwickelte, lösliche Cellulosemembran eingesetzt. Das dafür entwickelte SC²-Verfahren bietet damit die Möglichkeit, eine so erzeugte Bibliothek in das Mikroarray-Format zu überführen (40). Dazu werden die Spots aus der Membran ausgestanzt und separat in Reaktionsröhrchen gegeben. Durch Zugabe eines TFA haltigen Auflösungsreagenzes werden die separierten Celluloseträger mit der darauf kovalent gebundenen Substanz (*compound-support conjugate*) in Lösung überführt. Nach einem anschließenden Fällungsprozess werden die Konjugate gewaschen und letztlich erneut aufgelöst. Auf diese Weise wird die Bibliothek in die flüssige Phase überführt, wobei jede einzelne Lösung einen aufgelösten Spot mit der cellulosegebundenen Substanz enthält. Die so erhaltenen Stammlösungen können u. a. zur Herstellung von Mikroarrays durch Spotten auf Glasobjektträger (*spotting compound-support conjugate*, SC²) weiterverwendet werden. Dabei wird die adsorptive Wechselwirkung der gelösten Cellulose an die Glasoberfläche für die Immobilisierung der Substanzen ausgenutzt.

1.4 Mikroarrays in der klinischen Diagnostik

Wie schon gezeigt, bieten Mikroarrays durch ihre Sondenpräsentation ein hohes Potential für den diagnostischen Einsatz. Trotzdem besitzen die klinische Zulassung für eine diagnostische Anwendung momentan nur zwei Mikroarraysysteme (62), der AmpliChip® CYP450 von Roche (www.roche.com, Risch, Schweiz) und der MammaPrint® der Firma Agendia (www.agendia.com, Amsterdam, Niederlande) (Abbildung 11).

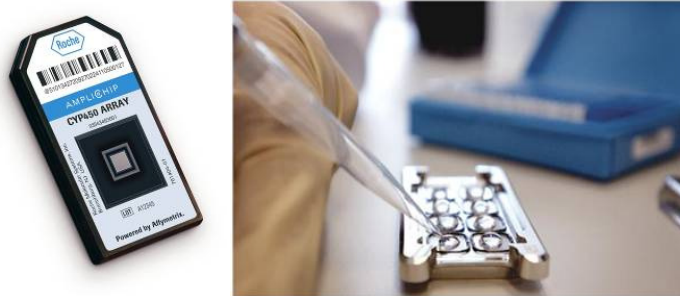


Abbildung 11: links: Ampli-Chip (www.roche.de), rechts: MammaPrint während der Probenauftragung (www.agendia.com)

Der AmpliChip basiert auf der Array Technologie von Affymetrix (vgl. Kap. 1.2.1.1). Mit Hilfe dieses Chips werden individuelle Stoffwechseleigenschaften genotypisch untersucht. Die Verstoffwechselungsrate eines Patienten bezüglich eingenommener Medikamente, Nährstoffen oder Toxinen kann so gemessen werden. Daraus kann eine Anpassung von Medikamentendosierungen abgeleitet und so die Ausprägung von Nebenwirkungen minimiert werden. Das Testsystem ist mit DNA Sequenzen als Sonden aufgebaut, die verschiedene genetische Variationen von Stoffwechselenzymen der Cytochrom P450 Familie codieren (63; 62). Patienten DNA wird aus einer Blutprobe isoliert, vervielfältigt und fluoreszenzmarkiert. Durch einen Hybridisierungstest auf dem Chip kann dann auf die persönliche Metabolisierungsrate des Patienten geschlossen werden.

Der 2007 zugelassene MammaPrint Array basiert ebenfalls auf DNA Sequenzen. Hier werden 1900 Oligonucleotidsonden verwendet, um Genexpressionslevel einer Brusttumorprobe zu testen. Durch die Aktivität der 232 somit untersuchten Gene wird dabei die Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsrückfalles berechnet. Nachfolgende Behandlungen können entsprechend angepasst, und unspezifische cytotoxische Chemotherapien vermieden werden (62; 64).

Die Erforschung von Mikroarrays erstreckt sich über weite Bereiche der medizinischen Diagnostik, wobei besonders die Krebsdiagnostik und die Entwicklung von infektionsdiagnostischen Arrays im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stehen (30). Beispiele von in der Forschung befindlichen Chips beschreiben die

Diagnostik von SARS (65), Herpes Simplex oder auch Hepatitis (A+B) und HI-Viren (17).

1.5 Hürden für die medizinisch diagnostische Anwendung

Trotz der jahrelangen intensiven Forschung auf dem Gebiet und einer fortschreitenden Kommerzialisierung, scheint eine Verwendung von Mikroarrays in der Routinediagnostik jedoch noch gehindert. Dies belegt die geringe Zahl von erst zwei für die Diagnostik zugelassenen Chips. Qualitätskontrollen, Lagerbarkeit oder die Vergleichbarkeit von Ergebnissen stellen noch immer technische Herausforderungen dar (30; 19). Im Falle einer *in situ* Sondenerzeugung ist selbst bei käuflich erwerbbaaren DNA-Chips eine zufriedenstellende Substanzreinheit nicht erreicht (66). Anbieter von Chips simultan synthetisierter Sonden sind z. B. Affymetrix (www.affymetrix.com), Agilent (www.agilent.com), Combimatrix (www.combimatrix.com) oder Nimble-Gen (www.nimblegen.com) (66). Die Synthese-Umsätze bei jeder einzelnen Sequenzverlängerung liegen unter 100 %. Dies bedeutet, dass ein signifikanter Anteil eines jeden Sondenareals nicht der gewünschten Zielsequenz entspricht, wobei die Ausbeute mit der zunehmenden Kettenlänge der Sonde weiter abnimmt. Eine zufriedenstellende Reinheit wird von Plattformen erzielt, bei denen keine Simultansynthese durchgeführt wird, die Sonden also erst nach der Synthese auf eine Oberfläche übertragen werden. Beispielsweise werden vorherige Reinigungsschritte per HPLC bei der Herstellung von CodeLink Arrays von GE Healthcare (www.gehealthcare.com) durchgeführt. Da hier die Proben jedoch auf die Oberfläche aufgebracht werden müssen, ergeben sich Probleme der Reproduzierbarkeit (67; 68; 69). So werden beispielsweise bei Anwendung des Kontaktdruckverfahrens die Sondenmoleküle von einem Hochpräzisionsroboter über Pins oder Spitzen aus Reservoirs auf die Plattform übertragen. Jeder einzelne Schritt bringt eine gewisse Fehleranfälligkeit mit sich. Jede Sonde wird separat aufgetragen, jeder Chip wird individuell hergestellt. Die Folge sind uneinheitliche Veränderungen in Bezug auf Spotposition, Größe, Form und Konzentration. Selbst eine Exaktheit von 99 % ergäbe beim Auslesen von 10.000 Datenpunkten 100 falsche Ergebnisse (70). Eine Qualitätskontrolle müsste für jeden Chip erneut stattfinden. Dies würde zu erheblichem Mehraufwand an Zeit und Kosten führen, was besonders eine patientennahe Verwendung erschwert. Für den Einsatz in der molekularen Diagnostik können momentan die hohen Qualitätsanforderungen noch nicht erfüllt werden, weshalb bisher nur die zwei oben genannten Chips (Kap. 1.4) klinisch zugelassen sind (62).

1.6 Zielsetzung

1.6.1 Konzept der Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Entwicklung eines neuen Herstellungsverfahrens für Mikroarrays, das insbesondere den hohen Anforderungen der diagnostischen Anwendung genügen soll. Dafür müssen für die einzelnen Herstellungsschritte technische und chemische Lösungsansätze gefunden werden. Letztlich soll ein prinzipielles Funktionieren des neuen Verfahrens im kleinen Maßstab aufgezeigt werden. Dazu sollen einerseits bereits bekannte Sondenmoleküle eingesetzt werden. Sollen dagegen neue Binder in einem diagnostischen Test verwendet werden, z. B. zur Optimierung einer bestehenden Methode, so müssen diese Sonden zuerst gefunden werden. Für die Suche solcher Moleküle soll hier die Sammlung einer großen Anzahl von Substanzen synthetisiert und getestet werden. Die Herstellung einer entsprechend großen Molekülbibliothek erfordert die Verwendung einer geeigneten Technik. Ziel ist deshalb, sowohl die kombinatorische Synthese, als auch die Suche nach bindenden Substanzen mit Hilfe eines bekannten Formats durchzuführen.

In einer Molekülbibliothek gefundene Binder könnten auf das neue Array-Format übertragen und dort potentiell diagnostisch eingesetzt werden.

1.6.2 Der Faden-Array

Die aktuell vorhandenen Herausforderungen in der Mikroarray Forschung (*Kap. 1.5*) bestehen besonders aus einer nicht optimalen Reproduzierbarkeit. Außerdem ergeben sich hohe Kosten und Schwierigkeiten bei der Qualitätskontrolle. Mit einem neuen Herstellungsverfahren sollen diese Probleme reduziert werden.

Jeder individuelle Teilschritt bei der Herstellung von Mikroarrays ist zu einem gewissen Grad fehlerbehaftet. Je höher die Anzahl dieser Schritte, wie z. B. das Spotten auf eine Oberfläche, desto wahrscheinlicher ergeben sich Fehler in den einzelnen Produkten. Bei der Herstellung vieler vermeintlich gleicher Chips liegt somit keine tatsächliche Identität aller Exemplare vor. Eine Qualitätskontrolle müsste für jeden Array erneut stattfinden. In dieser Arbeit soll ein Verfahren erarbeitet werden, bei dem aus einem einheitlichen, dreidimensionalen Vorläufer eine Vielzahl identischer Kopien reproduzierbar erhalten wird. Qualitätskontrollen können so im Idealfall auf sehr wenige Kopien beschränkt werden.

Damit eine Sonde auf jedem Exemplar identisch vorliegt (*Abbildung 12, A*), kann von einem dreidimensionalen Vorläufer (*Abbildung 12, B*) ausgegangen werden. Hier muss dazu jede Substanz die gesamte Länge des dreidimensionalen Körpers durchziehen (rote gestrichelte Linie). Durch anschließendes Schneiden werden somit

identische Kopien von Mikroarrays (*Abbildung 12, C*) erhalten. Eine drastische Reduzierung der einzelnen Herstellungsschritte senkt so die Fehleranfälligkeit bei der Produktion.

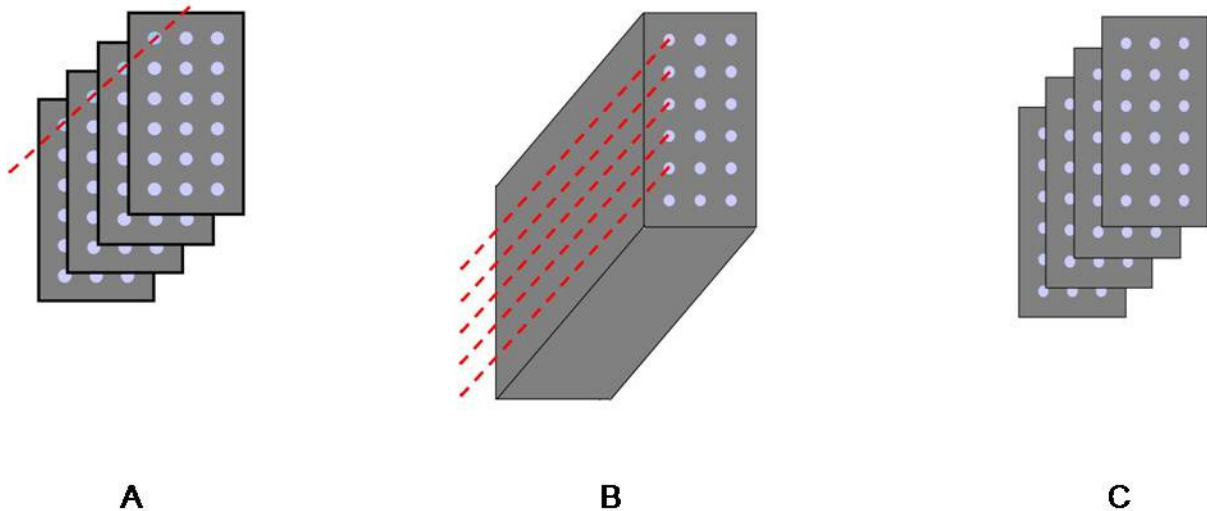


Abbildung 12: Schema der Herstellung von identischen Mikroarrays, A: Identität einer bestimmten Sondenposition bei mehreren Kopien von Arrays, B: Identität innerhalb eines 3D-Vorläufers, C: aus dem Block durch Schneiden erhaltene identische Kopien von Arrays

Für die von FRANK patentierte (71) Umsetzung soll der Vorläufer aus Fäden als Teilkomponenten bestehen. Jeder Faden soll ein Sondenmolekül bzw. eine Kontrollsubstanz enthalten. Die Fasern sollen zwischen zwei Flächen aufgespannt werden und durch Verdrillen ein dreidimensionales Bündel ergeben. Jeder Faden und somit jedes Sondenmolekül durchzieht dabei den gesamten dreidimensionalen Körper (*Abbildung 13*). Nachdem das Faserbündel fixiert ist, werden durch Schneiden die einzelnen Mikroarrays erhalten und auf einem Glasobjektträger (*Slide*) abgelegt. Eine Zuordnung der Sonden kann jederzeit über die örtliche Position und die Orientierung an Kontrollfasern erfolgen.

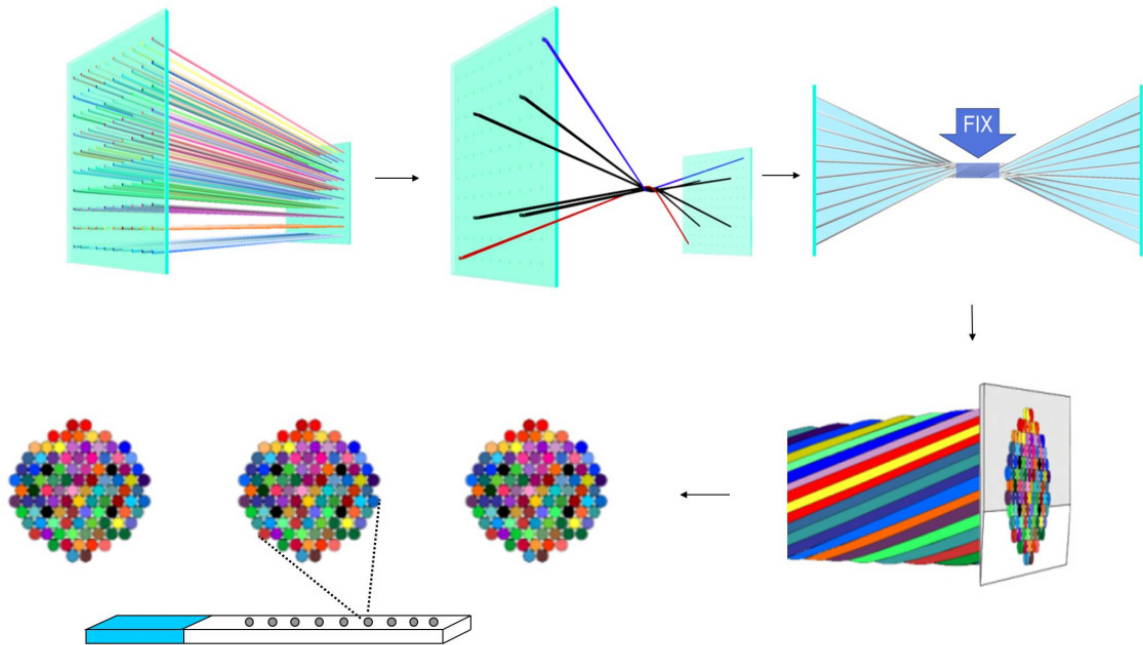


Abbildung 13: Herstellungsschema von potentiell identischen Kopien von Mikroarrays; jeder Faden/jede Farbe repräsentiert ein anderes Sondenmolekül; die schwarzen Fasern stellen Beispiele für Kontrollfasern dar

In der Literatur ist bisher nur eine Methode ähnlichen Prinzips beschrieben worden (72). Bei dem von Mitsubishi Rayon (www.mrc.co.jp) vertriebenen GenoPal[®] Chip werden Hohlfasern verwendet, um einen dreidimensionalen Vorläufer zu produzieren. Die Sondenmoleküle müssen in einer Gelmatrix vorgelegt und dann in die Hohlfasern gesogen werden. Die Fasern werden schichtweise übereinander gestapelt und zu einem Block fixiert. Durch Schneiden werden daraus die planaren Chips erhalten.

1.6.3 Die Molekülbibliothek

Das hier neu zu entwickelnde Format des Faden-Arrays sollte für eine Vielzahl von Sondentypen verwendbar sein. Verschiedene Substanzarten, die für eine diagnostische Verwendung auf Mikroarrays in Frage kommen, sind bereits an Cellulose oder Cellulosederivaten als fester Phase gebunden worden und konnten über Interaktionen mit Probensubstanzen detektiert werden. Kleine organische Moleküle (40; 60), Nukleinsäuren (21) oder auch Peptide (39) und Proteine (73) sind Beispiele für solche Sondentypen.

Ziel ist es, die Synthese von einigen hundert Sondenmolekülen zu konzipieren und an membranförmiger Cellulose als fester Phase durchzuführen. Weiterhin soll die generierte Substanzsammlung in ein bekanntes (40) Mikroarray-Format auf Glasobjektträgern überführt werden. An diesem Format werden Proteinbindungstests

durchgeführt, um neue Interaktionspartner zu finden. Diese können Potential für eine zukünftige diagnostische Verwendung aufweisen. Werden so in der Bibliothek Sonden gefunden, die ein getestetes Zielprotein binden, sollen diese Moleküle auf Fäden übertragen und anschließend auf dem Format des Faden-Arrays erneut über das gefundene Zielprotein detektiert werden.

So könnte die Funktionalität des Faden-Arrays nicht nur über bekannte Sonden, sondern zusätzlich auch an neuen, potentiellen Bindern von Biomarkern belegt werden. Der gesamte Prozess wäre damit repräsentativ für die Entdeckung neuer Sondenmoleküle und deren anschließenden Einsatz in einem diagnostischen Format.

2 Faden-Array

2.1 Anforderungen an das Fadenmaterial

Die Entwicklung des vorgestellten Faden-Arrays stellt bestimmte Anforderungen an das Fasermaterial. Essentiell ist hier die Fähigkeit zur Kopplung von Sondenmolekülen, während die Möglichkeit zur *in situ* Synthese direkt auf dem Träger nur optional ist. Außerdem muss das Material eine gewisse Porosität aufweisen. Die verwendeten Substanzen müssen in das Innere des Fasermaterials hinein diffundieren können, damit auch dort eine Anbindung erfolgt. Würden die Sonden nur auf der Fadenoberfläche gekoppelt, ergäben sich an den Fadenquerschnitten im Falle einer Interaktion mit fluoreszenzmarkierten Analytmolekülen nur kreisförmige Fluoreszenzbilder. Diese sind im Gegensatz zu flächigen Formen qualitativ und quantitativ schwierig auszuwerten. Weiterhin muss das Material chemisch funktionalisierbar sein oder funktionalisiert vorliegen, damit eine kovalente Immobilisierung der Sonden stattfinden kann. Die Fäden müssen chemisch stabil gegenüber allen eingesetzten Reagenzien sein. Ebenfalls nötig ist eine ausreichende mechanische Stabilität bei geringem Durchmesser. Die Form sollte einen einheitlich runden Querschnitt ergeben.

2.1.1 Fasermaterialien industrieller Herstellung

Fasern werden aus diversen Substanzen hergestellt und kommerziell vertrieben. Dabei werden neben natürlich erhaltenen Stoffen wie Seide, hauptsächlich synthetisch erzeugte Materialien verwendet. Die meisten dieser Fasern weisen jedoch chemische oder physikalische Schwachpunkte hinsichtlich der oben genannten Anforderungen auf. Die meisten sind nicht stabil gegenüber gängigen Chemikalien und Lösemitteln. Beispiele sind Fasern aus Celluloseacetat, Alginat, Chitosan oder Seide. Den sehr beständigen Polyolefinen fehlt dagegen die chemische Funktionalität. Außerdem weisen diese Fasern eine geringe Porosität und daher eine geringe Substanzaufnahme auf. Eine niedrige Zugänglichkeit kann ebenfalls bei teilkristallinen Polyamiden, wie Perlon oder Nylon, vorliegen. Mechanische Nachteile zeigen z. B. Chitosan, durch seine Zähigkeit, oder Perlon, welches eine sehr hohe Elastizität aufweist (74).

2.1.2 Cellulose als Fadenmaterial

Aus einer umfangreichen Sammlung von Fasermaterialien weisen Fäden aus regenerierter Cellulose die vielversprechendsten Eigenschaften auf. Das lineare Polysaccharid besteht aus $\beta(1-4)$ -verknüpften Glucoseeinheiten, wobei die kleinste Wiederholungseinheit das Disaccharid Cellobiose bildet (*Abbildung 14*).

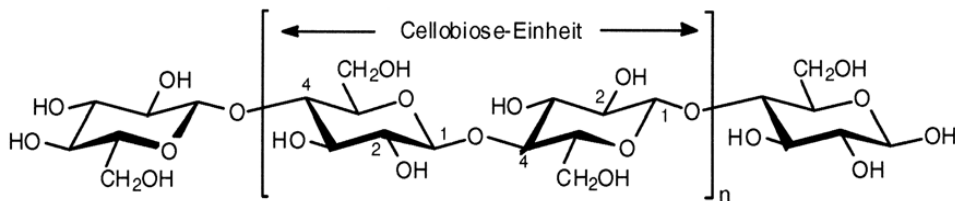


Abbildung 14: Ausschnitt einer Cellulosekette (75)

Zwischen benachbarten Monomereinheiten bestehen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, sowie auch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Ketten. Diese Wechselwirkungen haben entscheidenden Einfluss auf die charakteristische Festigkeit der Cellulose. Daraus ergibt sich außerdem die Unlöslichkeit in den üblichen Lösemitteln (75). Die Funktionalität von Cellulose ist durch den hohen Anteil an Hydroxylgruppen gegeben und kann durch Derivatisierung modifiziert und den Bedürfnissen angepasst werden. Die Möglichkeit der Verwendung von Cellulose als Trägermaterial ist zumindest in Form planarer Oberflächen bereits bekannt (39).

Cellulose lässt sich über verschiedene Methoden zu Fäden verspinnen. Die wirtschaftlich wichtigste Methode zur Herstellung solcher Fasern stellt der Viskoseprozess dar. Die Cellulose wird in das Xanthogenat überführt, wodurch sich eine Löslichkeit in alkalischem Medium ergibt. Aus der Lösung werden Fäden gesponnen und diese in einem sauren Fällungsbad vollständig präzipitiert. Die so erhaltene Viskose weist allerdings einen nicht runden Querschnitt auf (76). Außerdem besteht hier eine Kern/Hülle-Struktur; an Hand eines Farbstoffes konnte gezeigt werden, dass die notwendige Diffusion in die Kernregion solcher Fasern nicht stattfindet (76). Viskose erfüllt somit nicht die notwendigen Voraussetzungen für den Faden-Array.

Eine andere Methode zur Herstellung von regenerierten Cellulosefäden beruht auf der Auflösung von Cellulose in einem Gemisch aus NMMO in Wasser. Um daraus sogenannte Lyocellfäden zu erhalten, wird die hochviskose Lösung durch Düsen gepresst, und in Präzipitationsbädern verfestigt (77) und gewaschen. Die so gewonnenen Fäden weisen einen runden Querschnitt und eine glatte Oberfläche auf (76).

Solche Fasern werden hier grundsätzlich initialfeucht verwendet. Initialfeuchte Fasern werden direkt nach der feuchten Verspinnung feucht gehalten und waren grundsätzlich nie trocken. ABU-ROUS et al. konnten zeigen, dass sich die vorhandene Porosität von Lyocellfasern beim Trocknen irreversibel vermindert und die Eindringtiefe von Substanzen in die Fasern abnimmt (76).

2.1.3 Untersuchung des Fadenmaterials

2.1.3.1 Stabilität gegenüber Synthesereagenzien

Die Bereitstellung von Lyocellfäden erfolgt freundlicherweise vom Thüringischen Institut für Textil- und Kunststoffforschung (www.titk.de, Rudolstadt). Um die chemische Stabilität der Fasern zu untersuchen, werden je einige Zentimeter Faden den für die Peptidsynthese üblichen Lösemitteln und Reagenzien ausgesetzt. Die Cellulose wird dafür 7 Tage in der entsprechenden Flüssigkeit geschwenkt. *Tabelle 1* zeigt die verwendeten Reagenzien und gibt den sichtbaren Einfluss auf die Cellulose wieder.

Tabelle 1: sichtbare Effekte von Reagenzien auf Lyocellfäden nach 7d Schütteln

Reagenz/Lösemittel	Effekt an der Cellulose
DMF	kein
DMSO	kein
20 % Pip/DMF	kein
2 % Ac ₂ O/DMF	kein
DCM	kein
2 % Melm/DMF	kein
Entschützungsreagenz (TFA haltig)	Vollständige Auflösung

Die Lyocellfäden zeigen sich als chemisch sehr stabil gegenüber gängigen organischen Lösemitteln und basischen Substanzen (Piperidin, Methylimidazol), sie sind jedoch nicht stabil in stark saurem Milieu, wie z. B. dem Entschützungsreagenz. Das Reagenz wird in der Peptidchemie zur Abspaltung von Seitenschutzgruppen der Aminosäuren benötigt und enthält hauptsächlich die starke Säure Trifluoressigsäure (TFA) und Dichlormethan (DCM) (39). Das Reagenz führt bereits nach etwa 1 h zu einer starken Quellung. Außerdem ergibt sich eine mechanische Destabilisierung, so dass der Faden schon durch die Handhabung mit einer Pinzette reißt. Über Nacht löst sich die Cellulose vollständig auf. Dies ergibt sich durch partielle saure Hydrolyse

der verknüpfenden Acetalgruppen. Die Gegenwart starker Säuren führt außerdem zu einer Quellung durch das Aufbrechen inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Fäden zeigen sich abgesehen von Säureeinfluss als chemisch stabil. Demzufolge ist beispielsweise eine *in situ* Synthese von Peptiden auf dem Lyocellfaden prinzipiell möglich. Allerdings muss hier entweder auf die saure Abspaltung von Seitenschutzgruppen oder auf die Verwendung entsprechend geschützter Aminosäuren verzichtet werden. Genauso muss bei anderen Syntheseprotokollen auf sauer katalysierte Schritte verzichtet werden.

2.1.3.2 Aminierung und chemische Stabilisierung

Die Immobilisierung von Substanzen an Lyocellfäden als Trägermaterial soll untersucht werden. Generell kann eine Bereitstellung von Sonden auf einem Träger auf verschiedene Arten durchgeführt werden. So können insbesondere große, polymere Substanzen wie Polysaccharide oder Proteine (20), adsorptiv an Oberflächen gebunden werden. Für den prinzipiellen Einsatz von kleinen organischen Molekülen, Peptiden oder Nukleinsäuren auf dem Faden-Array wird hier die kovalente Kopplung untersucht. Dazu soll die Cellulose zunächst aminiert werden, um so eine höhere Nucleophilie auf dem Träger zu erzeugen. Die Aminogruppen werden mit einem Abstandshalter, einem sogenannten Spacer-Molekül, eingeführt. Der Spacer erhöht den Abstand immobilisierter Sonden zu der Oberfläche des Trägers und somit deren räumliche Flexibilität. Dies erleichtert die Bindung eines Analytmoleküls zu den präsentierten Sonden. Gleichzeitig soll eine molekulare Vernetzung der Cellulose zu einer Erhöhung der chemischen Stabilität der Fasern führen. Die genaue Durchführung beschreibt *Kapitel 5.4.1.2*. Zur Aktivierung (78) wird hier das Fadenmaterial mit einem hohen Überschuss an Carbonyldiimidazol (0,33 M CDI/DMF) über Nacht bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wird der gebildete Imidazolester mit einer 1 M Lösung eines Diamins in DMF umgesetzt, wodurch sich primäre Aminogruppen auf dem Faden ergeben (*Abbildung 15, oben*). Aus der Art des eingesetzten Amins ergibt sich die Struktur des Spacers, an dem die Aminogruppe präsentiert wird. Kürzlich haben auch ALILA et al. Carbonyldiimidazol (CDI) zur Aktivierung von cellulosischen Hydroxylgruppen an Natronzellstoff benutzt und eine anschließende Aminierung durchgeführt (79).

2. Faden-Array

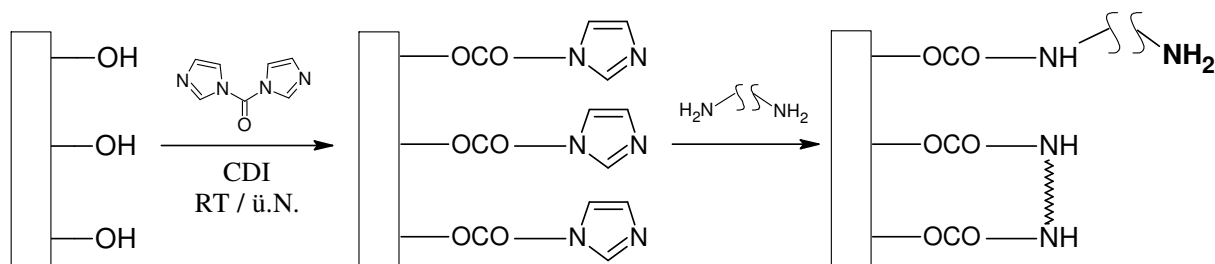


Abbildung 15: Aktivierung der Cellulose mit CDI und anschließender Umsetzung mit Diaminen führt einerseits zur Bildung primärer Aminogruppen (oben), andererseits zu einer Vernetzung der Cellulose durch das Diamin (unten)

Als Konkurrenzreaktion kann neben der einfachen Aminierung die Kopplung eines Diamins mit zwei verschiedenen aktivierten Imidazolestern ablaufen. Dies führt zur Vernetzung von Celluloseketten (*Abbildung 15, unten*) und somit möglicherweise zu einer erhöhten Stabilität der Cellulose. Auf Grund der hohen eingesetzten Aminkonzentration (1 M) sollte eine Vernetzung hier jedoch nur als Nebenreaktion ablaufen. Für die Aminierungsreaktion werden unter Verwendung von Jeffamin 500 (JA 500) verschiedene Reaktionszeiten systematisch untersucht. Jeffamine sind Etheramine, die die in *Abbildung 16* gezeigte Gruppe enthalten. Vereinfacht könnte man sie als Diamino-polyethylenglycole bezeichnen. JA 500 ist ein Diamin und besitzt eine mittlere molare Masse von $M = 600 \text{ g/mol}$, was einer durchschnittlichen Kettenlänge von etwa 38 Atomen entspricht. Die untersuchten Lyocellfäden sind aus einer Lösung von 8 % Cellulose ersponnen worden. Ihre Masse im getrockneten Zustand beträgt 8 mg/m.

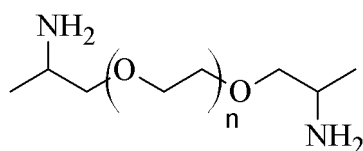


Abbildung 16: allgemeine Struktur verwendeter Jeffamine

Die Bestimmung der gebildeten primären Aminogruppen wird über eine Komplexierung mit Bromphenolblau (BPB) erreicht (80). Dabei wird durch Übertragung eines Protons von BPB auf die Aminogruppe ein immobilisiertes blaues Anion gebildet. Die Farbintensität aminierter Fäden variiert je nach Anzahl vorhandener Aminogruppen. In dem nicht basischen Lösemittel (DMF) zeigt BPB eine gelbe Farbe. Nach der Sättigung mit BPB werden die Fäden mit piperidinhaltiger Lösung behandelt, wobei der Farbstoff durch die Base aus den Fasern verdrängt wird und in das Lösemittel übergeht. Dieses wird anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 605 nm vermessen. Die Berechnung der vorhandenen Aminogruppen erfolgt nach Gleichung 1.

2. Faden-Array

Gleichung 1:

$$n = \frac{VF \cdot Abs}{\epsilon} \cdot \frac{V}{l}$$

n = Stoffmenge Aminogruppen [mol/m]

VF = Verdünnungsfaktor

Abs = Absorption

ϵ = Extinktionskoeffizient (95000)

l = Fadenlänge [m]

V = Volumen [l] der piperidinischen Lösung

Die Stoffmenge wird in Mol pro Meter Faden erhalten. *Tabelle 2* zeigt die untersuchten Reaktionszeiten und gibt die ermittelten Stoffmengen der gebildeten Aminogruppen wieder.

Tabelle 2: Einfluss der Reaktionsdauer auf die Aminierungsausbeute

Reaktionsdauer	Stoffmenge [nmol/m]
12 h	0,9
3 d	2,8
5 d	19
16 d	19

Bei den getesteten Reaktionszeiten von 12 h und von 3 d ergibt sich in beiden Fällen eine nur leichte Blaufärbung der Cellulose durch BPB. Die gleiche Ausbeute an Aminogruppen bei einer Reaktionsdauer von 5 Tagen und bei 16 Tagen zeigt, dass nach 5 Tagen die unter diesen Bedingungen höchstmögliche Aminierung bereits erreicht ist. Sie wird im Folgenden grundsätzlich als minimale Aminierungszeit eingesetzt.

Auf Grund der Konkurrenz von einfacher Aminierung und Vernetzungsreaktion sollte der Einsatz von kürzeren Diaminen zu einem erhöhten Anteil primärer Aminogruppen führen. Diese Theorie kann hier jedoch nicht bestätigt werden. Als weitere Diamine werden getestet: JA 300 ($M = 400$), JA 130 ($M = 230$) und 1,9-Diaminononan ($M = 158$). In allen Fällen ergeben sich Stoffmengen der gebildeten Aminogruppen von 0,02 $\mu\text{mol/m}$. Das JA 500 bildet die längste Molekülkette der untersuchten Amine. Da lange Abstandshaltermoleküle (*Spacer*) eine sterisch flexiblere Präsentation von Sondenmolekülen ergeben, werden alle weiteren Aminierungen mit diesem Diamin durchgeführt.

Folgende Versuche (*Kap. 5.4.1.2*) sind zur Erhöhung der Aminierungsrate durchgeführt worden:

Nach TOMLJENOVIC et al. (81) kann der Einfluss von Ultraschall die Sorptionsfähigkeit von Lyocellfasern beeinflussen. Eine mehrmalig durchgeführte Beschallung des Reaktionsgefäßes während der Aminierung führt in dieser Arbeit jedoch nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Aminierungsrate.

Von mehrwertigen Alkoholen wie Glycerol ist eine quellende Wirkung auf Cellulose bekannt (82), die höher ist als die von Wasser. Es wird untersucht, ob dies über eine Porenweitung zu einer besseren Zugänglichkeit innerhalb der Cellulosestruktur und somit zu einer erhöhten Aminierungsrate führt. Durch eine 15 minütige Vorbehandlung in 10 % Glycerol/Wasser und anschließendes Waschen mit DMF kann hier jedoch keine Verbesserung erreicht werden.

FRANK et al. (52) haben Cellulosescheiben kurzzeitig in 10 % TFA/DCM vorgequollen, um deren zugängliche Oberfläche für eine Funktionalisierung zu erhöhen. Die höchste Derivatisierungsrate ergab sich dort nach einer 20 minütigen Vorbehandlung in der verdünnten Säure (10 % TFA/DCM). Im Fall der untersuchten Cellulosefäden hat eine Vorbehandlung unter gleichen Bedingungen dagegen zu einer Abnahme der Aminierungsausbeute um den Faktor 4 (auf 0,005 $\mu\text{mol/m}$) geführt. Dies liegt vermutlich an der erheblich dünneren Form der Fäden gegenüber den Cellulosescheiben. Eine Anpassung auf das Fadenformat hätte wahrscheinlich durch eine zeitaufwändige Optimierung der Bedingungen durchgeführt werden können.

In *Kapitel 2.1.3.1* ist die Auflösung nicht behandelter Fasern in TFA haltigem Reagenz beschrieben worden. Neben der Bildung von Aminogruppen erfolgt bei der Reaktion mit CDI und Diaminen eine Vernetzungsreaktion (*Abbildung 15, unten*). Diese könnte zu einer Erhöhung der chemischen Stabilität gegenüber dem Auflösungsreagenz führen. Es werden Fäden getestet, die wie oben beschrieben mit einer 1 M Lösung an Jeffamin umgesetzt worden sind. Eine geringere Konzentration des Diamins sollte die Quervernetzung gegenüber der Bildung freier Amine begünstigen. Daher werden ebenfalls Fäden nach einer Reaktion in 0,1 M Lösung untersucht. In beiden Fällen wird jedoch keine höhere Stabilität bei Behandlung in TFA haltiger Lösung beobachtet.

Die untersuchten Lyocellfäden können unter Einsatz von Diaminen erfolgreich aminiert werden, wobei die optimalen Reaktionszeiten ermittelt wurden. Eine Ausbeutebestimmung erfolgt über den Nachweis von Aminogruppen durch Bromphenolblau. Bei der Verwendung verschiedener Diamine, als auch bei den untersuchten Vorbehandlungen zur Quellung der Cellulose, werden gleichbleibende

Aminierungsausbeuten beobachtet. Die Stabilität der Fasern gegenüber der TFA haltigen Lösung kann durch die vernetzende Reaktion während der Funktionalisierung nicht erkennbar gesteigert werden.

2.1.3.3 Einfluss verschiedener Additive auf die Fäden

An den bereitgestellten Lyocellfäden ohne Zusätze wird über die durchgeführte Aminierung zunächst nur eine geringe Funktionalisierung von 0,02 $\mu\text{mol/m}$ Aminogruppen erhalten (Kap. 2.1.3.2). Mit Hinblick auf eine Erhöhung der Aminierungsausbeute werden daher Fasern mit verschiedenen Additiven verglichen. Das Ziel ist dabei, durch die Einführung von Substanzen eine erhöhte Porosität innerhalb der Fäden zu erzeugen. Auf diese Weise soll die Zugänglichkeit der Fasern für die Aminierungsreagenzien und andere Substanzen gesteigert werden. Die jeweiligen Additive werden der gelösten Cellulose hinzugegeben und so direkt mit versponnen.

Dazu wird einerseits die Ausbeute erzeugter Aminogruppen über eine BPB Färbung verglichen. Andererseits wird deren örtliche Verteilung über einen Fluorophor visualisiert. Gesucht wird ein Additiv, welches die Ausbildung einer zugänglichen Porenstruktur innerhalb der Fäden und somit die Aminierungsausbeute erhöht. Zur Unterscheidung werden die in *Tabelle 3* angegebenen Bezeichnungen für die verschiedenen Fasern eingeführt.

Tabelle 3: eingeführte Bezeichnung für Lyocellfäden mit verschiedenen Additiven

Additiv	Faserbezeichnung (nicht aminiert)	Faserbezeichnung (aminiert)
-	$\text{PurLyocell}^{\text{OH}}$	$\text{PurLyocell}^{\text{NH}_2}$
Borsäure	$\text{H}_3\text{BO}_3\text{Lyocell}^{\text{OH}}$	$\text{H}_3\text{BO}_3\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$
Amylopektin	$\text{StarkeLyocell}^{\text{OH}}$	$\text{StarkeLyocell}^{\text{NH}_2}$
Kieselsäure, 30 %	$\text{SiO}_2,30\text{Lyocell}^{\text{OH}}$	$\text{SiO}_2,30\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$
Kieselsäure, 10 %	$\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$	$\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$

Einige Zentimeter $\text{PurLyocell}^{\text{OH}}$ werden auf je gleiche Weise aminiert und anschließend an den erzeugten Aminogruppen nach der allgemeinen Vorschrift biotinyliert (s. Kap. 5.2.2). Zunächst wird **Biotin** als aktivierter Ester (Biotinamidohexansäure-N-hydroxysuccinimidester) über die Aminogruppen an die aminierte Cellulose gekoppelt. Solche NHS-Ester werden schon bei Raumtemperatur durch primäre aliphatische Aminogruppen substituiert, wobei sich das entsprechende Amid unter Abspaltung von NHS bildet. Für die Kopplung wird die Cellulose über Nacht bei Raumtemperatur in einer Lösung von Biotinaktivester in DMF geschüttelt. Ein Einsatz von 1 mg/ml ergibt einen sehr hohen Überschuss gegen die

2. Faden-Array

Aminogruppen des Fadens und sollte zu einer nahezu vollständigen Biotinylierung führen. Nachdem die Fäden durch Waschen von ungebundenem Reagenz und Lösemittel befreit worden sind, werden sie getrocknet und entsprechend der allgemeinen Vorschrift (Kap. 5.2.5) geschnitten. Die Faserquerschnitte werden auf einem Glasobjektträger einem Bindungstest mit dem Biotinbinder Streptavidin unterzogen. Das Protein wird fluoreszenzmarkiert (Cy3) eingesetzt, so dass eine detektierte Fluoreszenz die Biotinkopplung an der Cellulose wiedergibt. Eine genaue Prozessbeschreibung für Bindungstests an Fadenquerschnitten findet sich in Kapitel 2.3. Die mit dem Fluoreszenzmikroskop detektierte Emission gibt indirekt die örtliche Verteilung der erzeugten Aminogruppen auf dem Querschnitt wieder. Die mikroskopische Aufnahme erfolgt jeweils bei derselben Belichtungszeit (500 ms).

Für $^{Pur}Lyocell^{NH_2}$ (Abbildung 17, a) zeigt sich, dass das Biotin nicht in das Fadeninnere diffundieren kann. Untersucht werden daher Fäden mit folgenden Zusätzen, welche vor dem Verspinnen zu der Lösung aus Cellulose in NMMO/Wasser gegeben werden. Fasern mit Additiven wie Borsäure (43 %), Amylopektin (30 % und 20 %) und pyrogener Kieselsäure (30 % und 10%) werden verglichen. Der prozentuale Anteil bezieht sich auf eine Monomereinheit der Cellulose.

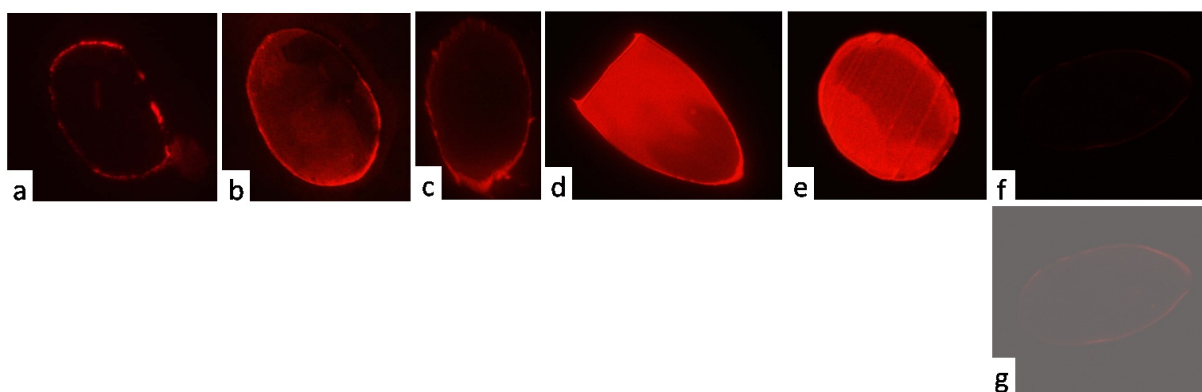


Abbildung 17: Querschnitte biotinylierter Fasern mit verschiedenen Additiven. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 500 ms Belichtungszeit nach Streptavidin-Cy3 Bindungstest; a: ohne Additiv; b: Borsäure; c: Amylopektin (30 %); d: SiO₂ (30 %); e: SiO₂ (10 %); f: SiO₂ (30 %), nicht biotinyliert (Negativkontrolle); g: Negativkontrolle in digital aufgehellter Form

Borsäure ist wasserlöslich und wird somit beim Waschprozess nach der Verspinnung aus der Fadenstruktur entfernt. Die Ausbeute erzeugter Aminogruppen an $H_3BO_3Lyocell^{NH_2}$ liegt ebenfalls bei 0,02 $\mu\text{mol/m}$ (Tabelle 4). Im Innenbereich der Faser zeigt sich (Abbildung 17, b) trotzdem eine geringe Zunahme der Fluoreszenz. Vermutlich kollabiert durch das Lösen der Borsäure die Porenstruktur nicht komplett, so dass das zugängliche Porenvolumen insgesamt vergrößert werden kann. Der Hauptteil der Fluoreszenz zeigt sich jedoch auch bei diesen Fäden im Randbereich.

Amylopektin ist ebenfalls wasserlöslich. Da es allerdings ebenso wie Cellulose ein Glucose haltiges Polymer ist, könnte es zu einer adsorptiven Haftung innerhalb der Fasern und somit zu einer stabilen Ausbildung eines porösen Netzwerkes führen. Mit $0,015 \mu\text{mol/m}$ ist die Aminierungsausbeute an $\text{Stärke-Lyocell}^{\text{NH}_2}$ jedoch noch ein wenig geringer als bei $\text{Pur-Lyocell}^{\text{NH}_2}$. Weder mit 20 % noch mit 30 % Anteil Amylopektin gegenüber der Cellulose kann außerdem eine zufriedenstellende Fluoreszenz erhalten werden. Eine Detektion erfolgt quasi nur im Randbereich (*Abbildung 17, c*).

Pyrogene Kieselsäure (SiO_2) besteht aus amorphen Nanopartikeln und ist praktisch nicht wasserlöslich (74). Mit einem 30 %-igen Zusatz zur Cellulose (9,0 mg/m Fadentrockenmasse) ergibt sich an $\text{SiO}_{2,30}\text{Lyocell}$ eine mehr als 100-fach höhere Aminierungsausbeute ($2,6 \mu\text{mol/m}$) gegenüber $\text{Pur-Lyocell}^{\text{NH}_2}$. Auf den entsprechenden Fadenquerschnitten zeigt sich eine gleichmäßige, intensive Fluoreszenz (*Abbildung 17, d*) über die gesamte Fläche. In *Abbildung 17, e* wird außerdem eine Reihe parallel angeordneter Streifen sichtbar. Dies sind Schleifspuren, die sich durch den gerichteten Schneideprozess ergeben.

Die nun erhaltene, gleichmäßige Fluoreszenz zeigt, dass durch das unlösliche Additiv eine Erhöhung der zugänglichen Porenstruktur erreicht wird. Die eingesetzte pyrogene Kieselsäure wird vom Hersteller (Degussa AG) als strukturell schichtbildend angegeben. Entsprechende Schichtabstände führen hier vermutlich zu Hohlraumbildung und erzeugen so ein zugängliches Volumen durch die Einlagerung in der Cellulose. Wie in der Abbildung sichtbar wird, vermindert das Additiv jedoch signifikant die mechanische Stabilität, so dass die Cellulose beim Schneidevorgang teilweise zerstört wird. Daher wird der Zusatz an SiO_2 auf 10 % reduziert (3,5 mg/m Fadentrockenmasse). An $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ kann eine ausreichende Festigkeit der Fasern bei einem zugänglichen und somit funktionalisierbaren Porenvolumen im gesamten Faserbereich erzielt werden (*Abbildung 17, e*). Die Menge erzeugter Aminogruppen ist an $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ mit $0,25 \mu\text{mol/m}$ noch mehr als 10-fach höher gegenüber $\text{Pur-Lyocell}^{\text{NH}_2}$. Damit gilt ein Fasertyp als gefunden, der zu einer hohen und gleichmäßigen Verteilung erzeugter Aminogruppen führt.

Als Kontrolle werden jeweils $\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ Fäden ohne Biotinylierung untersucht, um auszuschließen, dass das Additiv per se zur Fluoreszenz führt. Diese Proben zeigen bei gleicher Behandlung wie erwartet keine Emission. *Abbildung 17, f* zeigt als Beispiel den nicht fluoreszierenden Querschnitt von $\text{SiO}_{2,30}\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$. Zur Verdeutlichung wird der Kontrollquerschnitt außerdem in digital aufgehellter Form dargestellt (*g*).

2. Faden-Array

Tabelle 4: Vergleich von Lyocellfäden mit verschiedenen Additiven

Fäden	Erzeugte Aminogruppen [μmol/m]	Ort der Fluoreszenz
-	0,02	Rand
Borsäure	0,02	fast nur Rand
Amylopektin	0,015	Rand
SiO ₂ , 30 %	2,60	gleichmäßig
SiO ₂ , 10 %	0,25	gleichmäßig

2009 zeigten ÖZTÜRK et al. (83), dass sich bei einer Behandlung von reinem Lyocell mit Natronlauge das zugängliche Porenvolumen in Abhängigkeit von der Konzentration verändert. Damit bietet sich hier eine Möglichkeit zur weiteren Erhöhung der Aminierungsausbeute durch die Vergrößerung des für die Reagenzien zugänglichen Porenvolumens. Das größte Volumen der dort untersuchten Fäden ergibt sich durch Quellung in 2,5 M Natriumhydroxid. Eine entsprechende Vorbehandlung von $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ führt hier tatsächlich zu einer Erhöhung der Aminierungsrate. Es ergibt sich eine Erhöhung der Stoffmenge von 0,25 zu 0,6 μmol/m primärer Aminogruppen. Ein weiterer Grund für die durch diese Vorbehandlung verbesserte Aminierung könnte auch ein Herauslösen der hier vorhandenen Kieselsäure aus der Faserstruktur durch die alkalische Lösung sein. Auf diese Weise könnte eine zugängliche Hohlraumstruktur innerhalb der Cellulose gebildet werden.

Obwohl dadurch etwa eine Verdopplung der Aminierungsausbeute erreicht werden kann, wird diese Vorbehandlung nicht weiter angewendet. Einerseits ergibt sich zusätzlich eine mechanische Destabilisierung (83) der Fäden, andererseits ist die Ausbeute auf $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$, wie beschrieben, bereits ausreichend hoch.

Verglichen mit PurLyocell zeigen sich $\text{SiO}_2\text{Lyocell}$ Fasern als besser zugänglich für Aminierungsreagenzien und Biotinaktivester. Die Ausbeute erzeugter Aminogruppen kann durch Einsatz entsprechender Fäden um mehr als Faktor 10 erhöht werden. Getestete Lyocellfäden mit anderen Zusätzen führen dagegen nicht zu einer wesentlichen Veränderung in der Ausbeute. Somit eignet sich $\text{SiO}_2\text{Lyocell}$ für die Immobilisierung von Sondenmolekülen und wird für alle weiteren Experimente verwendet. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich im Folgenden dieser Arbeit um Cellulose mit dem entsprechenden Zusatz.

2.1.3.4 Durchlässigkeit gegenüber kleinen Molekülen und Peptiden

Sondenmoleküle sollen nicht nur auf der Fadenoberfläche, sondern auch gleichmäßig verteilt im Inneren der festen Phase immobilisiert werden. In *Abbildung 17* (Kap. 2.1.3.3) wird dies am Beispiel Biotin gezeigt. Nur so erhält man nach dem Schneiden eines Faserbündels anschließend eine flächige Präsentation der Sonden. Wie das Schema in *Abbildung 18* zeigt, würde eine nur kreisrunde Anordnung durch Kopplung auf der Fadenoberfläche zu Schwierigkeiten bei der Detektion führen. Auch eine quantitative Auswertung wäre so auf Grund der geringen Sondenanzahl problematisch. Voraussetzung für das Trägermaterial ist deshalb eine gewisse Porosität, so dass die Substanzen in die Fäden hinein diffundieren können.



Abbildung 18: Schema einer Sondendetektion auf einem Faserbündelschnitt; links: Sonden nur auf Fadenoberfläche, rechts: Sonden gleichmäßig innerhalb der Fasern verteilt

Deshalb soll hier die Durchlässigkeit der Fäden gegenüber kleinen organischen Molekülen und Peptiden untersucht werden. Getestet werden kovalent bindende und nicht-bindende Farbstoffe. Weiterhin werden Stoffe getestet, die als Sonde nur indirekt über ein fluoreszenzmarkiertes Protein detektiert werden. Über die Mikroskopie der jeweiligen Fadenquerschnitte kann an Hand der Farbe/Fluoreszenz die Durchlässigkeit der Cellulose gegenüber den entsprechenden Substanzen (*Abbildung 19*) untersucht werden. Eingesetzt werden jeweils Fäden von einigen Zentimetern Länge.

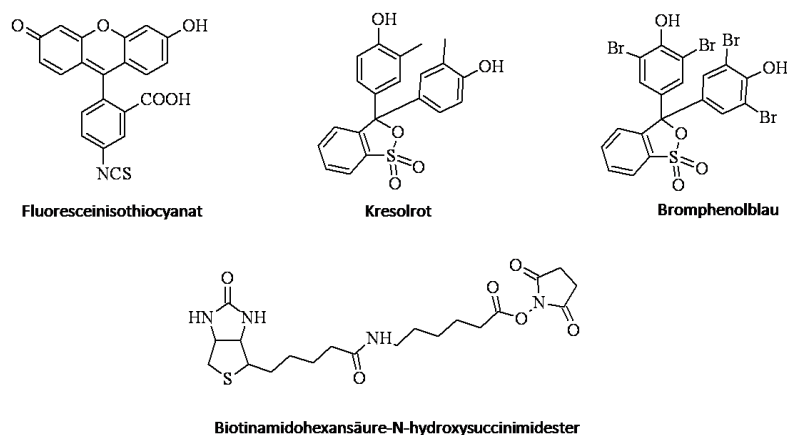


Abbildung 19: Verwendete Substanzen für die Untersuchung der Faserporosität

2. Faden-Array

Kovalent bindender Farbstoff: Zunächst werden hier Fäden ohne Zusätze hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit gegenüber dem Fluoreszenzfarbstoff FITC untersucht. $^{Pur}Lyocell^{NH_2}$ und $^{Pur}Lyocell^{OH}$ Fäden werden dazu separat in einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC) haltigen, alkalischen Lösung in DMF für einige Zeit geschüttelt. Von FITC ist für Proteine eine selektive Bindung an freie Amino- und Thiolgruppen bekannt. Entsprechend werden hier die nicht aminierten Fasern als Referenz eingesetzt, um eine Bindung des Farbstoffes an die Hydroxylgruppen der Cellulose auszuschließen. An aminierter Cellulose ergibt sich durch nucleophilen Angriff an das Isothiocyanat unter Ausbildung eines Thioharnstoffs eine kovalente Kopplung des Fluoresceins an die Fäden. Durch den Zusatz von Base (NaOH) wird die Nucleophilie der primären Aminogruppen weiter erhöht. Auf Grund einer Deprotonierung der Carboxylgruppe erfolgt dabei ein Farbumschlag der Lösung. Die Fasern werden nach der Behandlung gewaschen, um Lösemittel und überschüssiges Reagenz zu entfernen. Nach anschließendem Trocknen werden diese von einem Einbettmedium umgeben und durch Einfrieren fixiert. Aus der verfestigten Probe werden mit einem Mikrotom Querschnitte von 5 μm Dicke erzeugt, die auf einen Objektträger überführt werden (Details zu Einbettmedium und Mikrotomie s. Kap. 2.2). Die Bildgebung erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop.

Die hier erzeugten Faserquerschnitte aminierter Cellulose weisen eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenzfärbung auf (*Abbildung 20, a*). Folglich sind bereits die hier untersuchten $^{Pur}Lyocell$ Fasern für FITC Moleküle durchlässig. An der gleichmäßigen Kopplung innerhalb des Fadens zeigt sich somit außerdem, dass die Fasern auch für die Aminierungsreagenzien (*Kap. 2.1.3.2*) durchlässig sind.

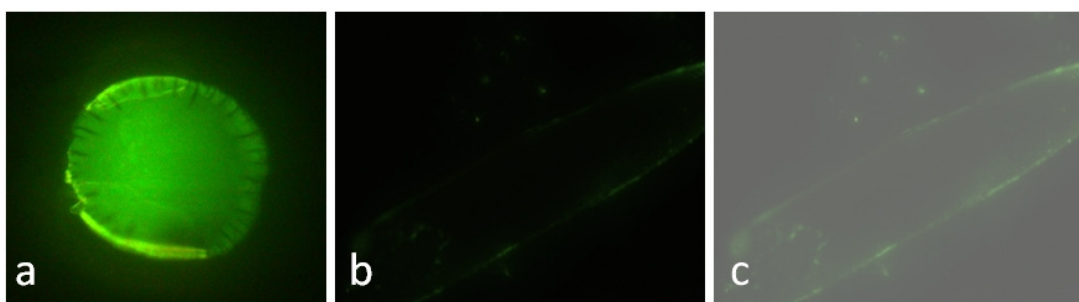


Abbildung 20: Schnitte von mit FITC behandelten Lyocellfäden; Ansicht unter dem Fluoreszenzmikroskop (500 ms Belichtungszeit); a: $^{Pur}Lyocell^{NH_2}$; b: $^{Pur}Lyocell^{OH}$; c: $^{Pur}Lyocell^{OH}$ (Bild digital aufgehellt)

Eine Kopplung des Isothiocyanats erfolgt bei Raumtemperatur nur über die erzeugten Aminogruppen, nicht aber über die Hydroxylgruppen der Cellulose. *Abbildung 21, b* zeigt einen Längsschnitt der nicht aminierten ($^{Pur}Lyocell^{OH}$) Referenzfaser nach der Behandlung mit FITC. Zusätzlich wird das Bild in digital aufgehellter Form dargestellt (c), um die Konturen zu verdeutlichen. Eine

Fluoreszenz ist der Kontrolle nur minimal im Randbereich zu erkennen. Vermutlich werden Spuren der Substanz durch Waschen nicht vollständig entfernt. Eine Kopplung an die Hydroxylgruppen findet folglich nicht statt.

Nicht-bindende Farbstoffe: Bezüglich der Durchlässigkeit der Lyocellfasern werden weiterhin zwei nicht-bindende Substanzen untersucht. Als Beispiel werden Bromphenolblau (BPB) und Kresolrot (KR) verwendet (*Abbildung 19*). Jeweils werden gesättigte ethanolische Lösungen hergestellt, um eine möglichst hohe Farbstoffkonzentration zu erhalten. In den Lösungen werden SiO_2 Lyocell Fäden über verschiedene Zeiten (1 h, 4 h, 24 h) geschwenkt. Untersucht werden jeweils aminierte und unmodifizierte Fäden um eventuelle Unterschiede zu erkennen. Die Cellulose wird anschließend so oft in Ethanol gewaschen, bis die Waschlösung farblos bleibt. Die aminierte Cellulose wird im Fall von BPB als blau bzw. im Fall von KR als orange erhalten. Die Farben entsprechen den Indikatorfarben für eine basische Umgebung auf den Fäden durch die Aminogruppen. Die nicht aminierten Fasern verbleiben als farblos. BPB bildet an den Aminogruppen von $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ ein immobilisiertes Salz, das durch sich anschließende Waschschrte nicht entfernt wird (vgl. *Kap. 2.1.3.2*). Entsprechendes gilt für das strukturell analoge KR. Dagegen erfolgt im Falle von $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$ keine Salzbildung der Farbstoffe an der Faser. Die Substanzen werden daher ausgewaschen. Die getrockneten Proben werden entsprechend der allgemeinen Vorschrift fixiert und geschnitten (*Kap. 5.2.5*). Unter dem Mikroskop zeigen sich die Querschnitte in den genannten Farben (*Abbildung 21, a+b*) für $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$, bzw. als farblose $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$ Fäden (*c+d*). Die Farbstoffe sind dabei gleichmäßig auf der Schnittfläche verteilt. Die einzelnen Fasern werden ohne bevorzugte Orientierung fixiert und geschnitten. Ein nicht runder Querschnitt (*a*) kann sich deshalb ergeben, wenn die Fäden nicht senkrecht zu ihrer Länge geschnitten werden.

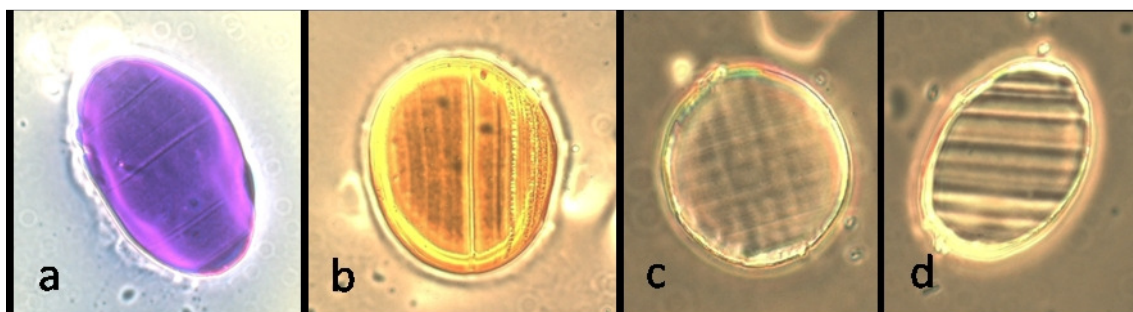


Abbildung 21: Querschnitte von mit Farbstoff behandelten Fasern; a: BPB an $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$, b: KR an $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$, c: mit BPB behandelte $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$, d: mit KR behandelte $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$

2. Faden-Array

Während für aminierte Fäden die zu erwartenden Indikatorfarben auftreten, verbleiben die nicht modifizierten Fäden entsprechend farblos. Für aminierte Cellulose kann durch die einheitliche Verteilung der Farbstoffe auf der Querschnittsfläche demnach die Durchlässigkeit gegenüber BPB und KR gezeigt werden.

Indirekt detektierbare Sonden: Diese Substanzen werden kovalent an $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ gebunden, und die Fäden wie üblich geschnitten. An den Fadenquerschnitten werden Proteinbindungstests (s. Kap. 2.3 & 5.2.6) mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Bindern durchgeführt, über die dann anschließend die indirekte Detektion stattfindet.

Die gleichmäßige Verteilung von Biotin als Sonde ist bereits in Kapitel 2.1.3.3 gezeigt worden. Eine erforderliche Porosität von $\text{SiO}_2\text{Lyocell}$ ist dementsprechend gegeben, damit Biotinmoleküle in das Innere eindringen und dort eine kovalente Kopplung an die aminierte Cellulose ausbilden können (Abbildung 22, links). Fäden mit anderen oder ohne Additive ergeben dagegen keine einheitliche Färbung (Kap. 2.1.3.3). Aminierte Fäden ohne Biotinylierung werden als Referenz eingesetzt und zeigen nahezu keine Fluoreszenz (Abbildung 22, mitte bzw. in aufgehellter Form rechts).

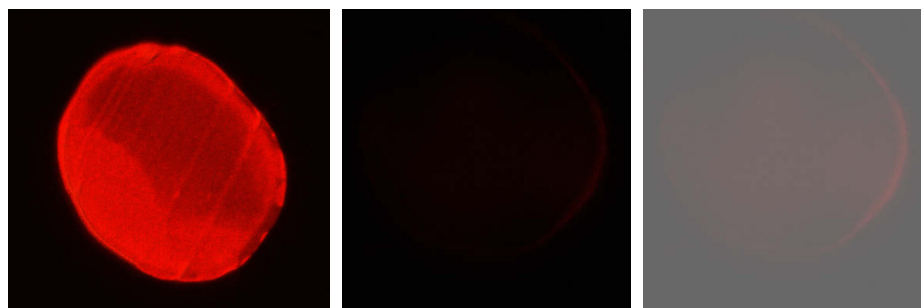


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 500 ms Belichtungszeit. Querschnitt eines biotinylierten Fadens $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ nach Behandlung mit fluoreszenzmarkiertem (Cy3) Streptavidin (links) und einer nicht biotinylierten Kontrolle (mitte); rechts wird die Kontrolle als digital aufgehellt dargestellt

Als weitere indirekt detektierbare Sonde wird ein N-acetyliertes **Peptid** ($\text{AcNYGKYE-}\beta\text{-Ala-Cys-NH}_2$; Buchstaben entsprechen dem Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren) hinsichtlich Diffusion und Kopplung im Fadeninneren untersucht. Damit wird nun eine Substanz mit einer vergleichsweise großen Masse ($M = 988 \text{ g/mol}$) eingesetzt. Dieses Peptid wurde bereits als Kontrollsonde für die Bindung zu dem monoklonalen Antikörper 1D3 (Dissoziationskonstante $K_d = 2,7 \mu\text{M}$) etabliert (40). Die ersten 6 Aminosäuren stellen das entsprechende Bindungsepitop aus dem Enzym Tubulin-Tyrosin Ligase dar (84), während $\beta\text{-Ala}$ als Abstandsmolekül (*Spacer*) dient. Über die Thiolgruppe des

2. Faden-Array

Cysteins soll eine kovalente Verknüpfung zur Cellulose erfolgen. Dafür wird die aminierte Cellulose entsprechend der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.2.2, b*) bromacetyliert. Über eine nucleophile Substitution des Broms kann das thiolhaltige Peptid an die Cellulose gebunden werden. Dazu werden Fäden von einigen Zentimetern Länge (Aminogruppen: 0,25 $\mu\text{mol}/\text{m}$) für 2,5 h in 3,5 ml einer 0,5 M Lösung (1,75 mmol) von Bromessigsäureanhydrid in DMF geschüttelt. Überschüssiges Reagenz wird durch Waschen entfernt. Das Peptid wird in angesäuertem MeCN/Wasser (1:1) gelöst. Anschließend wird auf einen leicht basischen pH-Wert durch Zugabe von 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,0) eingestellt, um eine hohe Nucleophilie der Thiolgruppe des Cysteins zu gewährleisten. Die Lösung wird zu den bromacetylierten Fäden gegeben, wobei das Peptid zur Kopplung in 3,5 ml einer 0,29 mM Lösung (1 μmol) vorliegt. Die Reaktion findet über Nacht bei Schütteln statt. Ungebundenes Reagenz wird durch Waschen entfernt. An den anschließend erzeugten Fadenquerschnitten wird ein Bindungstest mit dem monoklonalen Antikörper 1D3 durchgeführt, welcher spezifisch an das gekoppelte Peptid (1D3-Epitop) bindet (84). Über einen fluoreszenzmarkierten (Cy3) Zweitantikörper wird dann indirekt das Peptid auf den Fadenquerschnitten detektiert. Durch eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz kann so gezeigt werden, dass das Octapeptid in die Faser eindringt und dort an die bromacetylierte Cellulose bindet (*Abbildung 23*). Eine Kontrolle an Fäden ohne Bromacetylierung ist nicht durchgeführt worden, da nur geringe Mengen des Peptids zur Verfügung standen.

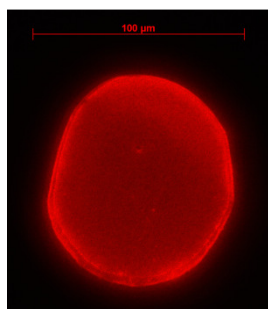


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Ansicht bei 500 ms Belichtungszeit. Querschnitt eines peptidhaltigen (1D3-Epitop) Fadens nach Behandlung mit mAk und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper

Im Randbereich zeigt sich eine erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem Inneren der Faser. Möglicherweise führt das hohe Molekulargewicht des Peptids zu einer verminderten Diffusionsgeschwindigkeit in die Cellulose. Als Konkurrenzreaktion läuft außerdem die oxidative Dimerisierung zweier Peptide zum Disulfid ab. Die Moleküle werden dadurch für eine Immobilisierung inaktiviert, so dass dieser Vorgang zu einer verminderten Kopplung innerhalb des Fadens führen kann. Da die Reaktion innerhalb der Faser durch die Diffusionsgeschwindigkeit limitiert wird (83), sollte im

Randbereich daher ein schnellerer und somit höherer Umsatz der Substitution erfolgen. Weiterhin kann eine nur unvollständige Kopplung innerhalb der Faser durch einen zu geringen Überschuss des Peptids erfolgen.

Die eingesetzten Farbstoffe (FITC, BPB, KR) stellen durch ihre aromatischen Anteile vergleichsweise sterisch anspruchsvolle Moleküle dar. Obwohl sie außerdem hydrophob (schlecht bis gar nicht wasserlöslich) sind, kann gezeigt werden, dass diese Substanzen in die getesteten Fäden aus polarer Cellulose (^{SiO₂}Lyocell) hinein diffundieren. Ebenfalls wird hier gezeigt, dass sowohl Biotin, als auch das höher molekulare 1D3-Peptid die Faseroberfläche passieren können. Dadurch ergibt sich eine gleichmäßige Verteilung auf der Querschnittsoberfläche, die durch Proteinbindungstests nachgewiesen wird. Das gleiche gilt für die Aminierung verwendete Jeffamin, da nur so auch im Fadeninneren Aminogruppen für die kovalente Kopplung bereitgestellt werden. Substanzen mit Molgewichten über 1000 g/mol sind nicht untersucht worden. Es ist jedoch anzunehmen, dass hochmolekulare Polymere, wie Proteine, die Peripherie der Faser nicht mehr durchdringen können.

2.1.3.5 Einfluss der Funktionalisierung auf Fadendicke und Reißfestigkeit

Als eine der Voraussetzungen für die Herstellung von Faserbündeln gilt eine gewisse mechanische Stabilität der Lyocellfäden. Eine Reißfestigkeit bezüglich der technischen Umsetzung ist notwendig. Weiterhin ist bei der Verwendung von Bündelschnitten als Mikroarrays ein konstanter Fadendurchmesser erforderlich, damit eine optimale hexagonale Faseranordnung bei der Bündelung erreicht wird. Bei der Handhabung von aminierten Lyocellfäden fällt ein signifikanter Nachlass in der Reißfestigkeit gegenüber der unmodifizierten Cellulose auf. Demzufolge wird eine mögliche Veränderung der Fadenform untersucht. Die Querschnitte einzelner loser Fäden, als auch eines Faserbündels werden mikroskopisch verglichen (*Abbildung 24*). Für den direkten Vergleich besteht das Bündel aus 3 funktionalisierten und 4 unmodifizierten Fäden. Für unmodifizierte Cellulose ergibt sich ein Durchmesser von 70 µm, während nach der Aminierung 90 µm erhalten werden.

2. Faden-Array

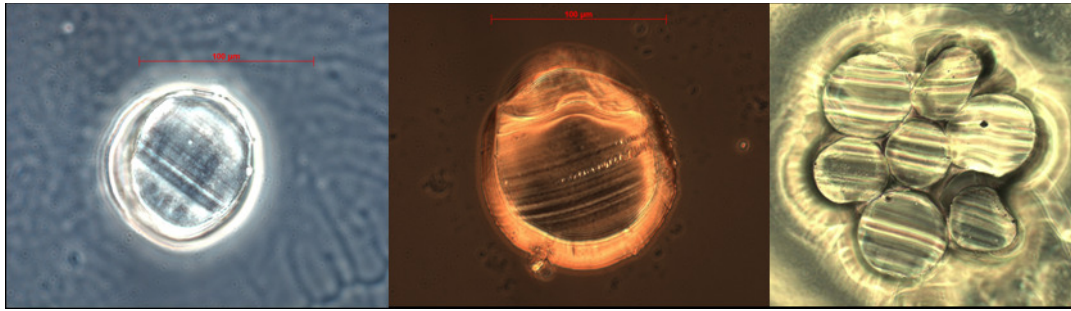


Abbildung 24: Verschiedene Durchmesser unmodifizierter (links) und aminierter Cellulosefäden (mitte); rechts: 7er Bündel aus 3 aminierten und 4 unmodifizierten Fäden

Diese irreversible Quellung des Fadens ergibt sich vermutlich einerseits aus der zusätzlichen sterischen Beanspruchung der gekoppelten Diamine in der Cellulose. Weiterhin wird eine veränderte molekulare Umgebung eine Auswirkung auf die strukturelle Ordnung des Polymers haben. Dadurch lässt sich dementsprechend ein vergrößertes Gesamtvolumen und damit ein größerer Fadendurchmesser erklären.

2.1.3.6 Untersuchung der Faserstruktur mittels TEM

Die notwendige Porosität der Cellulose ist mit Hilfe von Tests zur Durchlässigkeit der Fasern gegenüber organischen Substanzen gezeigt worden. Eine weitere Methode ist die bildliche Darstellung über Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Dafür werden ein aminiertes und ein unmodifiziertes Faserstück separat methanolisch gewaschen und initialfeucht gehalten. Durch eine mehrtägige Inkubation in einer Uranylacetat-Lösung soll eine Diffusion in die Faser erzielt werden. Die uranhaltige Substanz soll so das poröse Netzwerk in der Cellulose ausfüllen und als Kontrastmittel für die Mikroskopie dienen. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation mit einer verdünnten Monomerlösung eines Epoxidharzes, die später durch reines Monomer ersetzt wird. Dieses Harz wird üblicherweise für die Einbettung biologischer Proben vor TEM Untersuchungen verwendet (85). Nach der Fixierung der Fäden durch Polymerisation werden Ultradünnschnitte angefertigt und abgebildet. Obwohl hier durch TEM Messung der Kontrast räumlich ausgefüllter Strukturen gezeigt werden kann (*Abbildung 25*), handelt es sich bei den dunkel dargestellten Flächen nicht wie beabsichtigt um die uranhaltige Substanz. Mit Hilfe der anschließenden Durchführung von EELS (*electron energy loss spectroscopy*) kann gezeigt werden, dass der dargestellte Kontrast durch detektierte Siliciumatome des Celluloseadditivs zu Stande kommt. Zwischen aminierter und unmodifizierter Cellulose werden keine Unterschiede festgestellt.

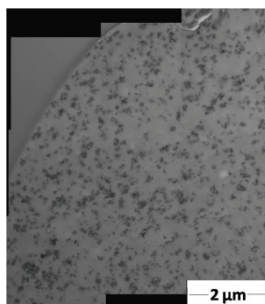


Abbildung 25: TEM Ansicht vom Teil eines Faserquerschnitts;
das Abbild ist aus einzelnen Teilaufnahmen zusammengesetzt worden

Auf anderem Wege konnte jedoch die Porosität und Durchlässigkeit gegenüber organischen Substanzen gezeigt werden (Kap. 2.1.3.3). Innerhalb biologischer Proben für die TEM Messung bindet das Uranylacetat bevorzugt an Phosphat-, Phosphoryl- oder Carboxylgruppen (86). Vermutlich findet in den Lyocell Fäden daher keine entsprechende ionische oder adsorptive Bindung der Uranylkationen statt. Während der Inkubation mit Harzmonomer in Methanol wird dann ein nachträgliches Auswaschen der Uranverbindung aus der Cellulose erfolgen. Die Porosität der Fasern kann hier mittels TEM nicht dargestellt werden.

2.1.4 Versuche zur Direktsynthese am Lyocellträger

Eine notwendige Eigenschaft für das Trägermaterial ist die Möglichkeit, Substanzen daran zu immobilisieren. Dagegen ist die Fähigkeit zur *in situ* Synthese von Substanzen direkt auf dem Trägermaterial nur optional. Hinsichtlich der Möglichkeiten werden hier dennoch Direktsynthesen zweier Substanzen auf den Lyocellfasern getestet.

2.1.4.1 Direktsynthese eines Tripeptids an Lyocellfäden

Die Synthese eines Tripeptids (AcKYG) wird entsprechend der Fmoc-Schutzgruppenstrategie (87) durchgeführt. Der synthetische Peptidaufbau an aminierten Lyocellfäden findet über ein im Säuren spaltbares Linkermolekül (Rink Linker (88)) statt, das auf ähnliche Weise zuvor an die Cellulose gebunden wird. Nach einer Abspaltung am Linker kann das Produkt dann als Säureamid erhalten werden. Einen Vorschlag für den Abspaltmechanismus gibt HERNÁN (89) (Abbildung 26).

2. Faden-Array

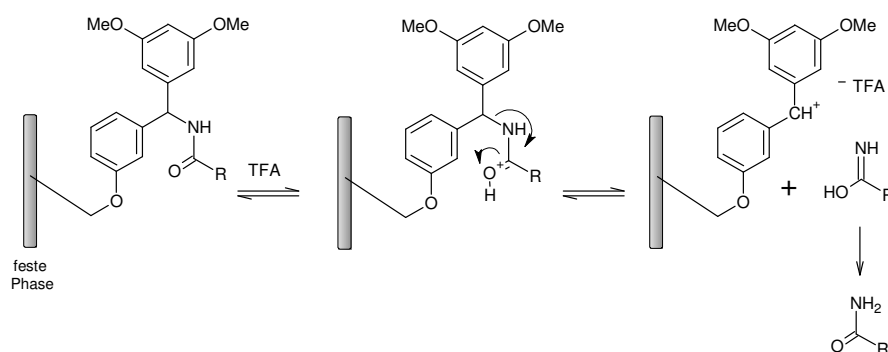


Abbildung 26: Mechanismus der Produktabspaltung vom Rink Linker (89)

Der Linker bzw. die einzelnen Aminosäuren werden für die Kopplung in N-Fmoc geschützter Form eingesetzt. Eine Entschützung nach jeder Kopplung wird durch die Base Piperidin eingeleitet. Die Fmoc Abspaltung verhält sich somit orthogonal zur sauren Spaltung des Linkermoleküls. Für die Kopplung des Rink Linkers wird dessen Carboxylgruppe durch einen Überschuss von Pentafluorophenol und DIC aktiviert. Der Linker selbst wird in über 20-fachem Überschuss zu den Fäden gegeben, um eine quantitative Umsetzung zu erreichen. Als Proben werden für einen Vergleich Lyocellfäden mit 30 % und mit 10 % SiO₂ untersucht. Zu der Reaktionslösung wird BPB gegeben, um eine Abnahme freier Aminogruppen durch die fortschreitende Kopplung des Linkers farblich sichtbar zu machen. Die Lösung wird je zu den Fäden gegeben, wobei auf Grund der basischen Aminogruppen sofort eine intensiv blaue Färbung der Cellulose eintritt. Die nicht basische Lösung verbleibt wie zu erwarten gelb. Nach der Reaktion über Nacht ist nur noch eine restliche schwach blaue Färbung vorhanden. Die entsprechend nicht umgesetzten Aminogruppen werden nach der Reaktion acetyliert (*capping*), um sie für weitere Reaktionsschritte zu blockieren. Dabei wird die Cellulose vollständig entfärbt. Nun wird durch Piperidin über eine Deprotonierung die Fmoc Schutzgruppe abgespalten. Unter Freisetzung der Aminogruppe des Linkers bildet sich in der Lösung ein Piperidin-Dibenzofulven Addukt, das photometrisch vermessen wird. Über die so bestimmte Konzentration wird die gekoppelte Stoffmenge des Linkers auf dem Träger nach Gleichung 1 (Kap. 2.1.3.2) berechnet. Als Extinktionskoeffizient gilt hier $\epsilon = 7800$, die verwendete Wellenlänge für die Absorption des Adduktes liegt bei 301 nm (90). Über die neu erhaltene Aminogruppe des Linkers kann nun analog die erste Fmoc-Aminosäure gebunden, entschützt und quantifiziert werden. Die Schritte wiederholen sich für jede weitere zu bindende Aminosäure, wobei Tyrosin und Lysin zusätzlich eine sauer abspaltbare Seitenschutzgruppe (tBu bzw. Boc) aufweisen. *Tabelle 5* gibt die für jeden Kopplungsschritt ermittelte Stoffmenge auf dem Celluloseträger wieder. Entsprechend einem sehr hohen Reaktionsumsatz vermindert sich die gemessene Stoffmenge nur wenig mit zunehmenden Kopplungsschritten.

2. Faden-Array

Tabelle 5: Über die Abspaltung der Fmoc Schutzgruppe bestimmte Ausbeuten der Kopplungsschritte bei der *in situ* Peptidsynthese an Lyocell

Reaktand	Kopplungsausbeute an 30 % SiO ₂ [μmol/m]	Kopplungsausbeute an 10 % SiO ₂ [μmol/m]
Rink Linker	4,7	2,7
Gly	4,6	2,7
Tyr(tBu)	4,1	2,4
Lys(Boc)	3,9	2,3

Analog einem capping wird das Tripeptid abschließend N-terminal acetyliert, um Folgereaktionen an der freien Säure zu vermeiden. Ein Vergleich von *Tabelle 4* (Kap. 2.1.3.3) und *Tabelle 5* zeigt, dass sich bei der Beladungsbestimmung über die Fmoc Schutzgruppe insgesamt größere Werte ergeben als bei der Quantifizierung freier Aminogruppen durch BPB. Die Methode der Fmoc Bestimmung ist hier genauer, da direkt die Konzentration der vorher kovalent gebundenen Schutzgruppe vermessen wird. Bei der Anfärbung mit BPB finden hingegen vor der Entfärbung mit Piperidin Waschschrte statt (Kap. 5.2.3), die die Menge des in der Cellulose nur ionisch gebundenen Indikators vermindern können. Abweichungen beider Methoden zueinander könnten sich weiterhin aus unterschiedlich genauen Extinktionskoeffizienten ergeben. Dennoch zeigt sich mit beiden Methoden, dass die Verwendung eines höhere SiO₂ Anteils in einer höheren Beladung resultiert.

Hier kann die Möglichkeit zur Peptidsynthese direkt an den Fäden belegt werden. Auf Grund der Labilität der Fasern gegenüber TFA (Kap. 2.1.3.1) ist jedoch eine saure Abspaltung der Seitenschutzgruppen nicht möglich, ohne den Träger zu beschädigen. Für eine Charakterisierung kann dennoch das Molekül sauer durch TFA in der Gasphase von der Cellulose abgespalten werden, wobei gleichzeitig die Entschützung erfolgt.

Charakterisierung:

Zusätzlich zur indirekten Charakterisierung des Produktes über die Fmoc Bestimmung wird die Substanz am Linker abgespalten und per LC/MS (ESI) analysiert. Die Durchführung erfolgt analog der Analytik von Substanzen, die auf membranförmiger Cellulose synthetisiert wurden (Kap. 5.3.11). Die Abspaltung erfolgt zuvor durch TFA in der Gasphase nach der allgemeinen Vorschrift (Kap. 5.3.10), wobei sich der Träger durch das gebildete Linker-Kation (*Abbildung 26*) rot färbt. Zusätzlich werden in der sauren Atmosphäre die Seitenschutzgruppen an Tyr und Lys abgespalten. Das erzielte Produkt verbleibt nur noch adsorptiv auf dem Träger und kann so durch Waschen in eine Lösung überführt und vermessen werden. Auf Grund der hohen Polarität des Peptids ergibt sich eine

2. Faden-Array

sehr geringe Retentionszeit bei etwa 1,0 min und der Produktpeak wird durch den Lösemittelpeak (DMSO) überlagert (*Abbildung 27*). Die gesuchte Masse von ($M+H^+$) = 409 wird aber eindeutig gefunden. Die weiteren erhaltenen Massen entsprechen der zu erwartenden Fragmentierung nach Abspaltung einer Aminogruppe ($m/z = 391$) bzw. dem Natrium- und Kaliumaddukt ($m/z = 431$ bzw. 447) des Produktes. Nach *Tabelle 5* ergibt sich die Produktausbeute bezogen auf die Stoffmenge an Rink Linker je nach Faserart zu 83 % bzw. 85 %.

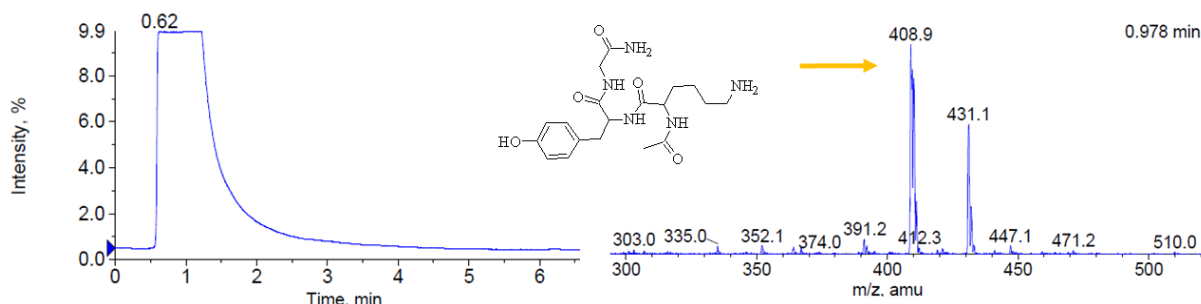


Abbildung 27: Charakterisierung per LC/MS; links: UV-Spur, rechts: Massendetektion bei 0,98 min

2.1.4.2 Direktsynthese eines substituierten Purins an Lyocellfäden

Die Erzeugung eines C-6 substituierten Purins an $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ wird nach den für membranförmige Cellulose optimierten Bedingungen (Beschreibung s. *Kap. 3.1.3*) durchgeführt. Dazu werden wie bei der Tripeptidsynthese zunächst Rink Linker und anschließend eine Aminosäure (Prolin) an funktionalisierte Fäden gebunden. Die Cellulose wird mit DMSO gewaschen und DMSO-feucht gehalten, da dieses das Lösemittel der folgenden Reaktionslösung darstellt. Die feuchten Fäden werden auf einer Weflonplatte (s. *Kap. 5.3.4*) positioniert und mit einer Pipette von überschüssigem DMSO befreit. So kann die zuzugebende Reaktionslösung möglichst unverdünnt von den Fäden aufgenommen werden. In sehr hohem Überschuss gegenüber den Aminogruppen auf den Fäden wird 2-Fluoro-6-chloropurin in angesäuertem DMSO auf die Fäden gegeben (*Kap. 5.4.1.7*). Unter Glasabdeckung wird die Chlorsubstitution durch Prolin in der Mikrowelle durchgeführt. Glas ist für Mikrowellen annähernd transparent und wird nicht durch die Strahlung aufgeheizt. Im Falle der Lyocellfäden führen die verwendeten Bedingungen zu einer teilweisen Braunfärbung und Verschmelzung von Fadenteilen (Karamellisierung). Ursprünglich durchgängige Fadenteile werden teilweise gebrochen. Da im Gegensatz zu membranförmiger Cellulose hier keine einheitliche Fläche vorliegt, sondern eher ein unebenes Knäuel von Fäden, ergibt sich keine glatte Abdeckung durch die Glasscheibe. Dies führt zu einem schnelleren

2. Faden-Array

Verdampfen von Lösemittel und damit zur Austrocknung und Karamellisierung der Cellulose. Dennoch wird eine Abspaltung der Syntheseprodukte von den Fäden durchgeführt, wobei sich die zu erwartende Rotfärbung durch das Linker-Kation ergibt (*Abbildung 28*).

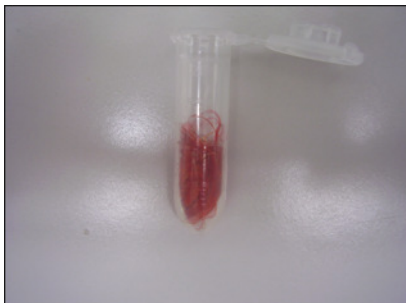


Abbildung 28: lose Lyocellfäden nach der sauren Abspaltung von 2-Fluoro-6-prolinylpurin

Charakterisierung:

Wie in *Abbildung 29* dargestellt, liefert die Vermessung des Rohproduktes per LC/MS (APCI) einen Hauptpeak bei einer Retentionszeit von 3,1 min. Die frühe Elution steht mit der Polarität des Zielmoleküls in Einklang. Weitere kleine Peaks bei späterer Elution können über die erhaltenen Massen nicht zugeordnet werden und entsprechen vermutlich Nebenprodukten durch Karamelisationsreaktionen. Die aus dem Produktpeak erhaltene Quasimolekülmasse ($(M+H^+) = 251,1$) weicht nur um 0,1 Einheiten von der berechneten ab. Die weiteren erhaltenen Massen entsprechen den zu erwartenden Fragmentierungen nach Abspaltung der Amino- ($m/z = 234,2$) bzw. der Amidgruppe ($m/z = 206,3$).

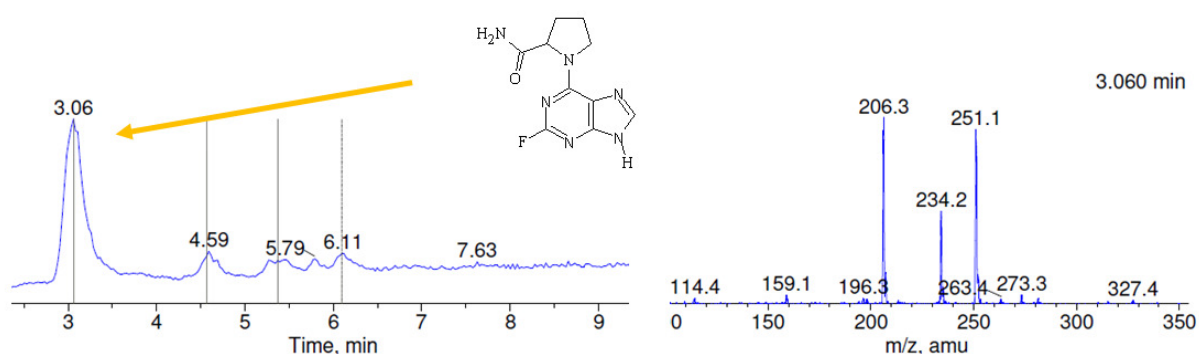


Abbildung 29: Struktur des Zielproduktes 6-Prolinylpurin und Ergebnis der LC/MS Analytik; links: Ionenspur; rechts: Massendetektion bei 3,06 min)

Die Synthese eines C-6 monosubstituierten Purins an Lyocellfäden kann gezeigt werden. Allerdings limitieren die unter Verwendung von Cellulosemembranen ermittelten (*Kap. 3.1.3*) harten Bedingungen die sinnvolle Übertragung auf die Fäden. Ein Teil der Fasern wird hierbei zerstört und die Fäden sind partiell zu nicht mehr

handhabbaren Knäueln verschmolzen. Eine saure Abspaltung des Produkts vom Träger in der Gasphase kann jedoch durchgeführt werden. Eine Charakterisierung per LC/MS wird somit ermöglicht.

2.2 Faserbündel und Kryo-Schnitte

Die Entwicklung einer Vielzahl gleicher Mikroarrays soll sich an dem in *Abbildung 13* (Kap. 1.6.2) gezeigten Schema orientieren. Für die Generierung eines Bündels aus Fäden durch Verdrillen muss zu jedem Zeitpunkt eine gewisse Spannung auf den Fasern lasten, da sie nur so eine nachvollziehbare Anordnung bei der Bündelung und auf den erzeugten Schnitten einhalten. Die nötige Spannung kann durch Gewichte erzielt werden, die jedoch nicht zum Reißen der Cellulose führen dürfen. Die Faseranordnung sollte möglichst kompakt sein, damit die auf den Chips vorhandenen Sonden in hoher Dichte präsentiert werden können. Die dichteste Packung von Fasern mit rundem Querschnitt wird durch eine hexagonale Anordnung erreicht.

Vor dem Schneiden muss eine Verfestigung des Bündels stattfinden. Die Fäden sollten so fixiert sein, dass sie beim Schneiden nicht verrutschen oder zerstört werden. Dies wird desto besser erreicht, je vollständiger ein verwendetes Fixierungsmedium die Fasern umgibt oder am besten sogar durchtränkt. Anschließend muss die umgebende Substanz zur Erstarrung gebracht werden können. Dazu sollte sie in flüssiger Phase auf die Lyocellfäden gegeben werden, bevor sie nach der Bündelung durch einen weiteren Vorgang verfestigt wird. Mögliche Medien sind Stoffe, die durch Abkühlung erstarren, oder Monomerlösungen, die das Bündel über eine Polymerisation fixieren. Hier bietet sich die Verwendung eines Einbettmediums aus der Histopathologie an. Üblicherweise werden dort Gewebeproben in eine viskose Mischung aus PEG und Polyvinylalkohol eingebettet und bei -20 °C gefroren und geschnitten. Die Polarität des Mediums erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die ebenfalls polaren Lyocellfasern durchtränkt werden. Da die funktionalisierte Cellulose PEG-Gruppen aus den Jeffaminketten enthält (s. Kap. 2.1.3.2), erhöht der PEG Anteil des Mediums ebenfalls die Möglichkeit, durch die Fasern aufgenommen zu werden.

In der Histopathologie werden die auf diese Weise eingebetteten Gewebeproben mit einem Kryo-Mikrotom in mikrometerdünne Teile geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Entsprechend bietet sich hier an, die Bündelschnitte analog den Gebeschnitten mittels dieser bekannten Technik zu erzeugen.

Für die Umsetzung und damit zusammenhängende Versuche im Rahmen dieser Arbeit wird eine einfache Laboranordnung verwendet. In einer späteren Verwendung

2. Faden-Array

in einem optimierten Prozess müsste dieser Aufbau professioneller gestaltet, und entsprechende Geräte konstruiert werden.

Hier werden die Fäden vorsichtig mit einer Nähnadel durch die hexagonal arrangierten Löcher zweier paralleler Lochplatten (*Abbildung 30*) gezogen. Über die Anordnung der Fäden auf der Lochplatte wird direkt die Anordnung der Sondenmoleküle auf dem Faden-Array bestimmt. Für die Vergleichbarkeit aller Bündelungsexperimente wird grundsätzlich ein konstanter Plattenabstand (8 cm) eingehalten. Der Lochabstand beträgt 3 mm bei einem Durchmesser von 1,5 mm.

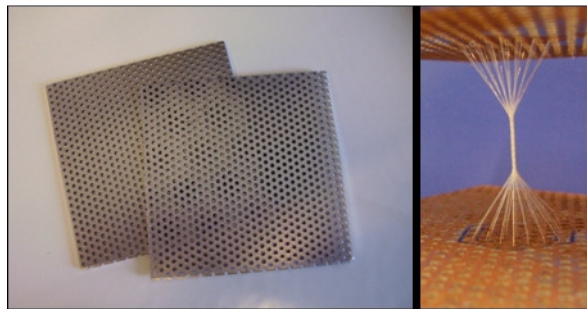


Abbildung 30: links: Lochplatten für die Herstellung von Faserbündeln, rechts: Bündelung von 36 Fäden zwischen 2 Lochplatten

Es werden immer benachbarte Löcher besetzt, so dass zwischen besetzten Löchern keine Zwischenräume auf den Lochplatten entstehen. So befinden sich die Fäden schon vor der Verdrillung in räumlicher Nähe. Für die nötige Straffung wird jeder Faden einzeln am unteren Ende mit einem Gewicht beschwert. Dadurch wird außerdem eine Flexibilität in der Längsbewegung der Fasern gewährleistet. Diese ist nötig, da durch die Aufwicklung bei der Verdrillung jedes lose Fadenstück kontinuierlich in Richtung des Bündels verkürzt wird. Die Befestigung am oberen Ende erfolgt, ebenfalls separat, über eine Klammer. Um Schwingungen, und damit arretierende Verknotungen der unteren Fadenteile, zu vermeiden, werden diese mit dem Gewicht in ein mit Wasser gefülltes Becherglas getaucht. Zur Bündelung der parallel und straff hängenden Fäden wird die untere Lochplatte langsam um die Mittelachse gedreht. Für eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Bündelungsexperimenten wird grundsätzlich die gleiche Anzahl an Drehungen durchgeführt. Unmittelbar vorher wird das flüssige Einbettmedium auf die obere Lochplatte gegeben, damit es von dort während der Verdrillung entlang der Fäden hinunterläuft. So soll erreicht werden, dass im Bündel auch zwischen den Fasern Fixiermedium vorhanden ist. Das fertige Bündel wird einige Zeit hängen gelassen um vorzutrocknen. Dadurch tritt bereits eine gewisse Festigkeit ein. Bei der Abtrennung des Bündels mit einer Schere soll dadurch eine Entwinden der Fäden vermieden werden. Das Bündel wird senkrecht in ein Eppendorfgefäß überführt, welches

anschließend mit zusätzlichem Einbettmedium aufgefüllt wird. Durch stoßweises Tauchen in flüssigen Stickstoff erfolgt die schnelle Erstarrung von Bündel und Medium. Eine Lagerung findet vor dem Schneiden bei -20 °C statt.

2.2.1 Haftung von Schnitten auf verschiedenen Glasobjektträgern

Mikroarrays werden für Bindungstests eingesetzt, wobei sie verschiedenen Wasch- und Inkubationsschritten ausgesetzt werden. Die hier herzustellenden Arrays bestehen aus Schnitten, die auf einem Glasobjektträger abgelegt werden. Bei der Durchführung solcher Tests muss sichergestellt sein, dass die Fadenquerschnitte auf dem Glaträger haften ohne herunter gewaschen zu werden. Dazu werden Objektträger mit unterschiedlicher Beschichtung hinsichtlich der Haftung der Cellulose während eines Proteinbindungstests untersucht. Getestet werden Slides mit silanisierter Oberfläche, mit NHS-Ester haltiger Beschichtung, sowie auch Träger, die mit kommerziellem Klebstoff bestrichen sind. Ein Knäuel loser biotinylierter Fäden wird geschnitten und mehrere Schnitte auf dem jeweiligen Glaträger aufgebracht. Resultierend aus dem verwendeten Knäuel enthält dabei jeder Objektträger etliche Fadenquerschnitte in wahlloser Anordnung und Orientierung. Nach der Durchführung eines Streptavidin-Bindungstests werden die Slides unter dem Fluoreszenzmikroskop verglichen. Während bei silanisierten Objektträgern keine Faserschnitte gefunden werden, zeigen sich auf den klebstoffhaltigen Slides noch einige Fasern. Sehr viele fluoreszierende Querschnitte sind auch nach dem Test noch auf den NHS Slides vorhanden.

Ein absoluter Anteil haftender Fäden wird hier nicht bestimmt. Eine besondere Haftung funktionalisierter Querschnitte auf Aktivester haltigen (NHS) Objektträgern resultiert vermutlich auf der Ausbildung von kovalenten Bindungen. Übrige, nicht biotinylierte, Aminogruppen der Fasern könnten eine nucleophile Substitution an den Aktivestergruppen der Glasoberfläche eingehen und so die Querschnitte auf der Oberfläche immobilisieren. Für alle weiteren Bindungstests erfolgt daher die Verwendung von trockengelagerten, NHS-Ester haltigen Trägern.

2.2.2 Einfluss der Schnittdicke auf die Fadenanordnung

Einer der Vorteile des zu entwickelnden Mikroarray Formates ist die Möglichkeit aus einem einzigen Vorläuferbündel durch Schneiden eine hohe Anzahl von Chips zu erzeugen. Je dünner die entsprechenden Schnitte, desto mehr Exemplare können erhalten werden. Daher ist es sinnvoll, die geringstmögliche Schnittdicke zu verwenden, bei der die Fadenanordnung im Bündel durch den Schneidevorgang nicht beeinflusst wird.

2. Faden-Array

Dazu werden aus unmodifizierten Fäden ein Bündel von 7 und ein Bündel von 36 Fäden erzeugt. Jeweils werden verschiedene Schnittdicken zwischen 5 μm und 50 μm generiert, und die Schnitte unter dem Mikroskop hinsichtlich Form und Anordnung verglichen.

Für ein 7er Bündel zeigt sich (*Abbildung 31, c*) bei einer Schnittdicke von 50 μm die gewünschte hexagonal dichteste Anordnung ohne Verschiebungen durch den Schneidevorgang. Mit abnehmender Dicke nehmen Falschanordnungen durch Verschiebung und Verformung der Fäden zu (*Abbildung 31, a+b*). Die gleiche Tendenz ergibt sich entsprechend für ein 36er Bündel (*Abbildung 32*), wobei allerdings hier selbst bei 50 μm Schnittdicke die gewünschte Anordnung nicht erreicht wird.

Es kann hier gezeigt werden, dass die technische Voraussetzung für einen Faden-Array im kleinen Maßstab erfüllt wird. Somit wird die Präsentation von verschiedenen Positionen auf einem solchen Array für das kleinste Format von 7 Sondenpositionen ermöglicht. Für die korrekte Anordnung der Querschnitte ergibt sich dabei eine Schnittdicke von 50 μm als notwendig. An Bündelschnitten von 36 Fasern wird die erzielte Anordnung dagegen nicht erfüllt. Eine Zunahme der Qualität mit der Schnittdicke ist jedoch auch hier zu beobachten.

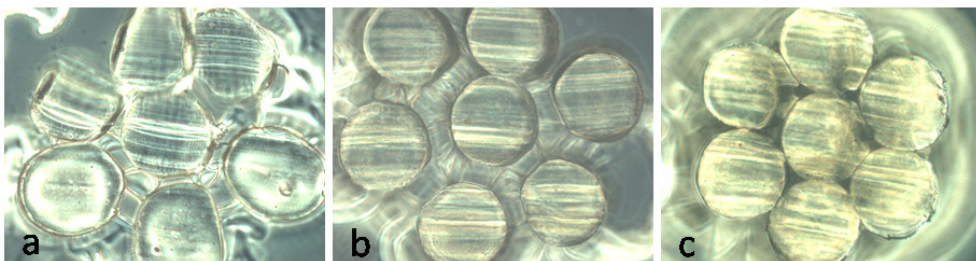


Abbildung 31: Mikroskopische Ansicht von Schnitten verschiedener Dicke aus 7er Bündeln, a: 5 μm , b: 25 μm , c: 50 μm

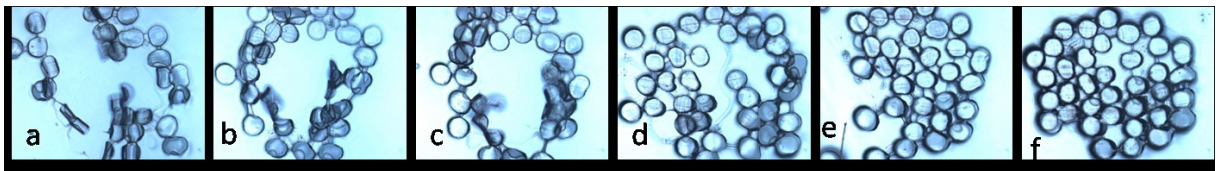


Abbildung 32: Mikroskopische Ansicht von Schnitten verschiedener Dicke aus 36er Bündeln a: 10 μm , b: 16 μm , c: 20 μm , d: 30 μm , e: 40 μm , f: 50 μm

2.2.3 Versuche zur Optimierung der Faseranordnung im 19er Bündel (1)

Offensichtlich ergibt sich mit einer Zunahme der Fadenanzahl im Bündel eine erhöhte Schwierigkeit, die gewünschte hexagonale Anordnung zu erhalten. Die richtige Anordnung jeder Faser ist essentiell, wenn eine Zuordnung der Sonden auf einem Mikroarray über deren Position durchgeführt wird. Erhöht man die Fadenanzahl von einem 7er Bündel mit hexagonaler Anordnung um eine Reihe, dann wird ein 19er Bündel erhalten. In der mikroskopischen Darstellung sollte sich dementsprechend ein sechskantiger Querschnitt ergeben, bei dem jede Kante aus 3 Faserteilen besteht (*Abbildung 33, a*).

Falschanordnungen sind u. a. auch schnittdickenabhängig (*Kap. 2.2.2, s.o.*). Trotzdem wird vermutet, dass diese nicht nur während des Schneidevorgangs oder bei dem anschließenden Transfer auf die Glasobjektträger nachträglich auftreten. Einen entscheidenden Einfluss sollte insbesondere der Vorgang von Bündelung und Fixierung haben.

Nur wenn die einzelnen Fäden von erstarrendem Medium umgeben oder sogar durchtränkt sind, kann eine Fixierung gegenüber den Kräften beim Schneidevorgang vorhanden sein. Daher wird hier der Einfluss des Mediums bei der Bündelung getestet.

Die Bündelung von 19 nicht funktionalisierten Fäden wird zunächst analog der Herstellung eines 7er Bündels unter unveränderten Bedingungen durchgeführt. *Abbildung 33, b* zeigt, dass ein Großteil der Fadenquerschnitte nicht die richtigen Positionen besetzt. Das verwendete Einbettmedium ist eine viskose Flüssigkeit. Deswegen wird vermutet, dass sich dieses bei der Bündelung zwar wie gewünscht zwischen einzelne Fasern setzt, jedoch nicht wieder ausreichend durch sich eng anlegende Fäden verdrängt werden kann. Dies würde die Bildung von mit Medium gefüllten Zwischenräumen und eine daraus resultierende Positionsveränderung der Lyocellfäden erklären.

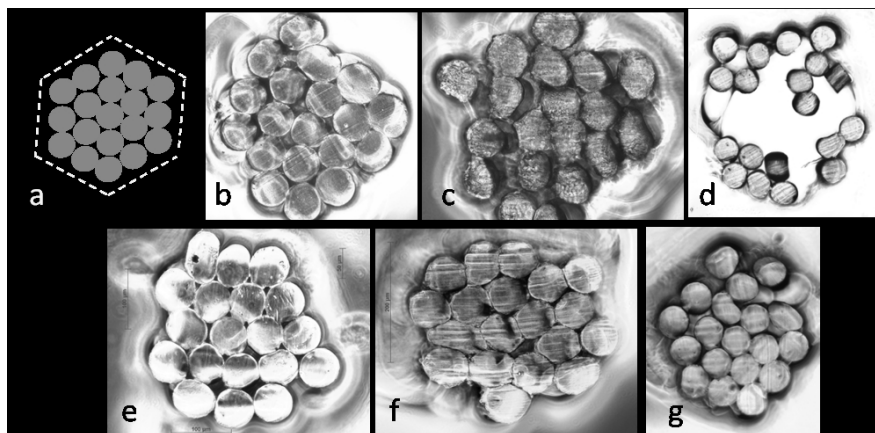


Abbildung 33: Querschnitte von 19er Bündeln unterschiedlicher Herstellungsbedingungen; a: ideale Anordnung, b: reines Medium bei RT, c: 10 % H₂O, d: 10 % Ethylenglycol, e: erwärmtes Medium, f: -70 °C Fixierung, g: vergrößerter Aufspannwinkel

Zur Verringerung der Viskosität wird u. a. der Einfluss zweier Zusätze zum Medium mit Hinblick auf die Faseranordnung im Bündel untersucht. Ein verdünnender Zusatz muss in dem Medium löslich sein, und sollte für die Fixierung ebenfalls einen Schmelzpunkt im Bereich von 0 °C bis -20 °C aufweisen.

10 % Wasser: Der Zusatz von Wasser erhöht das Fließverhalten sichtbar. Das mit dem veränderten Medium fixierte Bündel zeigt allerdings keine Verbesserungen der Querschnitte. Wie aus (*Abbildung 33, c*) anhand der Rauigkeit der Oberflächen ersichtlich, scheinen außerdem die Fasern beim Schneidevorgang eher zu brechen als glatt abgetrennt zu werden.

10 % Ethylenglycol: Durch die Verwendung von 10 % Ethylenglycol (Smp.: -16 °C) wird die Viskosität der Flüssigkeit deutlich gesenkt. Zusätzlich nimmt jedoch auch die Härte in gefrorenem Zustand ab, so dass sich Schwierigkeiten bei der Mikrotomie ergeben. Die schwer zu erhaltenen Schnitte weisen große mittige Zwischenräume auf (*Abbildung 33, d*). Diese treten wahrscheinlich beim Schneiden auf, da das zu weiche Medium die Fasern nicht ausreichend fixieren kann.

Erwärmung: Eine Erwärmung des Mediums führt ebenfalls zu einer deutlichen Viskositätsabnahme. Bei der Verwendung von 45 °C warmer Substanz wird zwar das Entlangfließen an den Fasern erleichtert, jedoch werden auch hier keine besseren Anordnungen erhalten (*Abbildung 33, e*).

Eine Erhöhung der Fließfähigkeit des Einbettmediums wird durch Zusätze von Wasser, bzw. Ethylenglycol oder durch eine Erwärmung des Mediums erreicht. Die gewünschte Optimierung der Faseranordnung kann hier jedoch nicht durch Veränderungen der Viskosität des Mediums erreicht werden.

2.2.4 Versuche zur Optimierung der Faseranordnung im 19er Bündel (2)

Ein anderer Grund für die Fehlordnung könnte eine Umordnung der Fäden nach der Bündelung sein. Obwohl das von Medium umflossene Bündel zwar nach der Verdrillung einige Zeit vortrocknet (s. *Kap. 2.2*), und sich dadurch das Einbettmedium schon ein wenig verhärtet, besteht bei der Abtrennung u. U. die Möglichkeit eines teilweisen Entwindens.

Daher wird das noch arretierte Bündel mit der gesamten Apparatur nach der Vortrocknung für 15 min bei -70 °C gelagert, um eine vollständige Erstarrung des Einbettmediums zu erreichen. Das Bündel wird in der Kälte abgetrennt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dieses wird zügig mit flüssigem (Raumtemperatur) Medium aufgefüllt und stoßweise durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren.

Auch durch die Fixierung des Bündels bei -70 °C kann hier keine optimale Anordnung erhalten werden (*Abbildung 33, f*).

Voraussetzung für das Erreichen einer optimalen hexagonalen Anordnung ist ein entsprechendes Einfügen jedes Fadens in die gewünschte Position. Daher wird versucht, durch einen größeren Aufspannwinkel α (Abbildung 34) der äußeren Fadenreihe, ein genaueres Einfügen zu erreichen. Im so erhaltenen Querschnitt ist jetzt ansatzweise die gewünschte sechskantige Form erkennbar (Abbildung 33, g). Allerdings sind noch immer wenige Fehlordnungen einzelner Fäden zu erkennen.

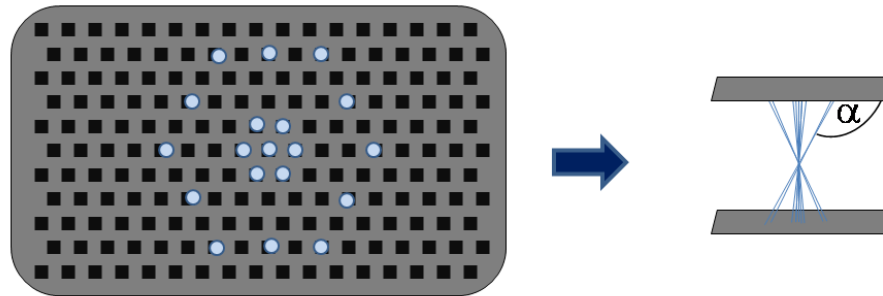


Abbildung 34: schematische Darstellung eines vergrößerten Aufspannwinkels; Eine Anordnung der 19 Fäden auf der Lochplatte unter Abstand der äußeren Fadenreihe (links) führt zu einem vergrößerten Winkel α (rechts)

Insgesamt kann eine deutliche Verbesserung der Faseranordnung auf den Bündelschnitten erzielt werden. Das beste Ergebnis liefert die Kombination von erwärmtem Medium, Gefrieren des Bündels vor der Abtrennung und einem vergrößerten Aufspannwinkel. Die Ergebnisse zeigen, dass technische Verbesserungen möglich sind. Mit der Entwicklung von professionellen Fasertechniken und entsprechenden Geräten sollten daher größere Bündel herstellbar sein.

2.3 Proteinbindungstests an Fadenquerschnitten

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, das prinzipielle Funktionieren des neuen Verfahrens im kleinen Maßstab aufzuzeigen. Die Herstellung eines hexagonal angeordneten Arrays aus 7 nicht funktionalisierten Fäden ohne Sondenmoleküle konnte bereits gezeigt werden (Kap. 2.2.2). Auf diesem Format soll nun auch die generelle Verwendbarkeit als Mikroarray dargestellt werden. Dazu soll ein Molekül als Sonde auf einigen der 7 Fäden immobilisiert und in einem Proteinbindungstest durch einen bekannten Interaktionspartner gebunden und so detektiert werden. Fäden die nicht das Sondenmolekül tragen, werden nicht detektiert und dienen dadurch als Negativkontrolle.

Für einen Bindungstest werden Querschnitte des erzeugten Bündels auf NHS-Aktivester beschichteten Objektträgern abgelegt (*Kap. 5.4.3.1*). Die Glas Slides werden grundsätzlich liegend behandelt, und alle Lösungen (1-3 ml) werden sehr vorsichtig bis zur vollständigen Bedeckung auf den Träger pipettiert. Dadurch werden Strömungen gering gehalten, um ein mechanisches Ablösen der Cellulosequerschnitte vom Objektträger zu vermeiden. Grundsätzlich wird unter gepuffertem pH-Wert gearbeitet, um die Aktivität der Proteine zu erhalten.

Zuerst wird das Einbettmedium mit Wasser angelöst, um die Celluloseoberfläche freizugeben. Beginnend mit diesem Schritt werden vermutlich Bindungen noch freier Aminogruppen von der Cellulose zu den NHS-Aktivestern auf den Objektträgern ausgebildet, welche für die Haftung auf den Trägern verantwortlich sind (*Kap. 2.2.1*). Durch eine Inkubation mit einem Blockierungspuffer wird die gesamte Oberfläche über unspezifische adsorptive Bindungen durch Blockierungsproteine, wie z. B. BSA, abgesättigt. So soll ein unspezifisches Binden des späteren Testproteins unterdrückt werden. Das Zielprotein kann fluoreszenzmarkiert eingesetzt werden. Eine positive Bindung zu einem Sondenmolekül kann so nachfolgend über Fluoreszenzemission nachgewiesen werden. Ausgehend von den in *Kapitel 2.1.3.3* ermittelten Stoffmengen ergibt sich für einen 50 µm dicken Schnitt eine maximale Besetzung von Sondenmolekülen pro Faden im Picomol-Bereich. Für ein makromolekulares Protein ist vermutlich außerdem nur die Oberfläche dieses Fadens zugänglich. Dementsprechend bedeutet eine Verwendung von 2-10 µg/ml Testprotein einen Überschuss, der das dynamische Bindungsgleichgewicht in Richtung Komplexbildung verschiebt. Die Inkubation erfolgt in einer lichtdichten Feuchtigkeitskammer, um ein Verdampfen der Lösung und eine Verblässung (*photobleaching*) des eingesetzten Fluorophors zu vermeiden. Für nicht markierte Proteine, wie z. B. monoklonale Antikörper (mAk), erfolgt die Detektion durch die nachfolgende Inkubation mit einem Fluorophor tragenden (Zweit-) Antikörper. Die Objektträger werden abschließend durch Waschen von überschüssigen Reagenzien befreit und getrocknet.

2.3.1 Sondendetektion an Faden-Arrays aus 7er Bündeln

Als Beispiel für ein kleines organisches Sondenmolekül wird Biotin eingesetzt. Die prinzipielle Funktionalität des Faden-Arrays soll im kleinen Maßstab von 7 möglichen Sondenpositionen gezeigt werden. Dazu werden 3 der 7 Fäden biotinyliert, während die übrigen lediglich aminiert vorliegen und so als Negativkontrollen dienen. Als Zielprotein wird Cy3 markiertes Streptavidin eingesetzt.

Wie aus *Abbildung 35* ersichtlich, kann über die beschriebene Methode die spezifische Erkennung der Sonde Biotin gegenüber den übrigen Fäden gezeigt

werden. Einen hohen Einfluss auf die Sensitivität hat hier der Blockierungsprozess. Zwei Querschnitte des gleichen Bündels werden hinsichtlich der Blockierungsdauer verglichen. Der linke Teil der *Abbildung 35* zeigt die Schnitte nach einer Dauer von 1 h, im mittleren Bild dagegen nach 3 h. Im letzteren Fall wird die unspezifische Bindung des Zielproteins an die Negativkontrollen weitaus effektiver unterdrückt.

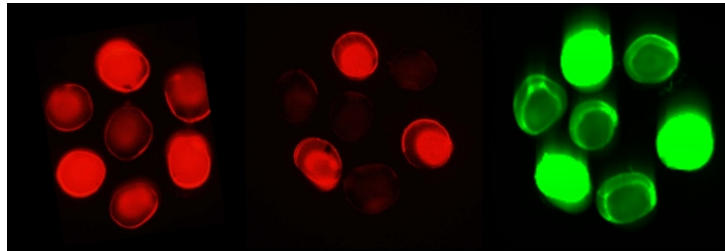


Abbildung 35: 7er Faden-Arrays (Biotin) nach Streptavidin-Cy3 Bindungstest, links: 1 h geblockt, mitte: 3 h geblockt, rechts: Bildgebung durch Mikroarray-Scanner

Diese Blockierungsdauer wird entsprechend für alle weiteren Proteinbindungstests auf Faden-Arrays verwendet. Weiterhin kann hier gezeigt werden, dass neben der Sondendetektion über ein Fluoreszenzmikroskop ebenfalls die Visualisierung durch einen üblichen Mikroarray-Scanner möglich ist (*Abbildung 35, rechts*). Die damit erhaltene hohe Belichtung verdeutlicht, dass für eine Detektion über diese Messmethode weitaus geringere Substanzmengen eingesetzt werden könnten. Außerdem ergibt sich damit die Möglichkeit, Auswertungen auf dem neuen Array-Format mit kommerziell erhältlichen Geräten durchzuführen. Daran kann sich eine Auswertung der Signale mit ebenfalls gängiger Software anschließen. Weiterhin wird hier gezeigt, dass sich bei der Bündelherstellung im Gegensatz zu den Bündeln unmodifizierter Fäden (*Kap. 2.2.2, Abbildung 31*) auffällige Zwischenräume ergeben. Diese sind auch vor der Durchführung von Proteinbindungstests vorhanden. Der Durchmesser der Fasern vergrößert sich durch die Aminierung (*Kap. 2.1.3.5*). Möglicherweise tritt beim Trocknen der Querschnitte auf den Objektträgern eine teilweise Schrumpfung ein, die zu den Zwischenräumen führt. Dies würde bedeuten, dass der ursprüngliche Durchmesser dieser Fasern vor der Fixierung entsprechend größer ist als die bestimmten 90 μm (vgl. *Kap. 2.1.3.5*).

In einzelnen Fällen findet eine Ablösung von Fadenquerschnitten während der Proteinbindungstests statt. Dies ergibt sich durch das Aufbringen und Abnehmen von Inkubations- und Waschlösungen. Entsprechend werden nicht immer die in *Abbildung 35* gezeigten, vollständigen 7er Bündelquerschnitte auf den Objektträgern erhalten. Als Beispiel für ein Peptid als Sondenmolekül wird das 1D3-Epitop eingesetzt. Auch hier werden 3 Fäden verwendet, an die die Sonde wie in

2. Faden-Array

Kap. 2.1.3.3 gekoppelt wurde. Die übrigen 4 Lyocellfasern dienen als Negativkontrolle. Die Anordnung ist asymmetrisch gewählt.

Wie in *Abbildung 36* dargestellt, wird auch die peptidische Sonde auf dem Faden-Array spezifisch erkannt. Weiterhin zeigt sich, dass hier einer der Querschnitte vom Glasträger abgelöst worden ist. Im Fall der peptidhaltigen Faserbündel kann nach dem Bindungstest in keinem Versuch ein vollständiger Array erhalten werden.

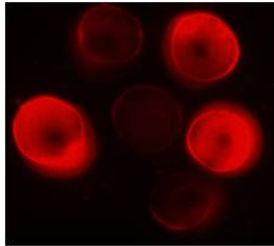


Abbildung 36: 7er Faden-Array (1D3-Peptid) nach Bindungstest mit mAk und Zweitantikörper; Verlust eines Fadenquerschnittes (u. li.)

Da das Peptid selbst freie Aminogruppen enthält, sollte eine mögliche Immobilisierung dieser Fäden an die Aktivester haltige Oberfläche eher besser funktionieren als bei biotinylierter Cellulose und so zu einer höheren Haftfähigkeit führen. Deshalb ist anzunehmen, dass die häufige Ablösung von Fasern besonders durch den hier zusätzlich notwendigen Inkubationsschritt mit dem Zweitantikörper begünstigt wird. Diese führt zu einer längeren Behandlungsdauer und zur vermehrten Anzahl von Waschschritten, welche auf die Querschnitte einwirken. Entsprechend wird versucht eine stärkere Anbindung der Faserquerschnitte auf dem Glasträger zu erreichen. Dazu werden einerseits die Glasträger vor dem Bindungstest für einige Zeit bei 50 °C im Trockenofen gelagert. Andererseits wird ein erhöhter pH-Wert während des Tests verwendet, um eine nucleophile Kopplung der Querschnitte an die NHS-Ester haltige Oberfläche zu begünstigen. Diese Veränderungen führen tatsächlich zu einem etwas verringerten Anteil an abgelösten Fäden, jedoch kann in keinem Fall der vollständige Faden-Array erhalten werden. Die Lagerung im Trockenofen, als auch der erhöhte pH-Wert werden für alle folgenden Versuch weiterhin eingesetzt.

Hier kann gezeigt werden, dass die Detektion von Sondenmolekülen auf den hergestellten Faden-Arrays gelingt. Die getesteten Sondenmoleküle Biotin und das 1D3-Epitop werden dabei spezifisch von den Zielproteinen erkannt, wobei der Einfluss des Blockierungspuffers auf die Sensitivität deutlich gemacht wird. Es ergibt sich ein klarer Kontrast zu den Kontrollfasern. Neben der Detektion über die Fluoreszenzmikroskopie kann hier auch die Verwendbarkeit eines üblichen

Mikroarray-Scanners gezeigt werden. Ein bisher ungelöstes Problem stellt die Anfälligkeit der Querschnitte gegenüber einer möglichen Ablösung während der Bindungstests dar.

2.3.2 Untersuchung der Homogenität eines Bündels

Der Vorzug des hier zu entwickelnden Mikroarray-Formats ist der Erhalt einer Vielzahl von identischen Exemplaren. Da jede einzelne Kopie eine ausgeschnittene Schicht eines Bündels darstellt, soll das Bündel, und damit jeder Faden, eine durchweg einheitliche Sondenpräsentation bieten. So kann jeder Querschnitt in einem Bindungstest vergleichbare Ergebnisse liefern.

Da die Lyocellfäden aus einer homogenen Lösung ersponnen werden, ist eine durchweg einheitlich Struktur zu erwarten. Daraus folgt, dass entlang der Faserachse kein Bereich gegenüber chemischen Modifizierungen bevorzugt ist. Im Überschuss eingesetzte Reagenzien sollten folglich zu einer gleichmäßigen Verteilung von Funktionalitäten entlang des Fadens führen. In diesem Versuch soll diese Homogenität untersucht werden.

Dazu wird ein 7er Faserbündel generiert. An 5 verschiedenen Stellen werden stichprobenartig je mehrere Schnitte erzeugt und diese hinsichtlich der Signalintensitäten nach einem Proteinbindungstest verglichen. Das Bündel, also auch jeder Schnitt, enthält 4 biotinylierte Fäden neben 3 Negativkontrollen (Aminocellulose ohne Sondenmolekül). Als Testprotein wird entsprechend Streptavidin-Cy3 eingesetzt. Um einen gewissen Abstand zwischen den zu untersuchenden Schnittstellen zu erhalten, wird jeweils ein Zwischenteil von 1000 µm verworfen. An jeder der 5 Positionen werden 4 Schnitte von 50 µm Dicke erzeugt und auf einem Objektträger abgelegt. Somit enthält jeder Glas Slide 16 biotinylierte Fadenquerschnitte. Davon werden einige durch den anschließenden Proteinbindungstest vom Objektträger abgelöst (vgl. Kap. 0). Die Querschnitte auf den 5 Glasträgern werden nach dem Bindungstest mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Für einen anschließenden Vergleich der Intensitäten werden identische Belichtungszeiten benutzt. Auf jedem Slide wird der Mittelwert aller positiven Signale ermittelt und grafisch aufgetragen (*Abbildung 37*).

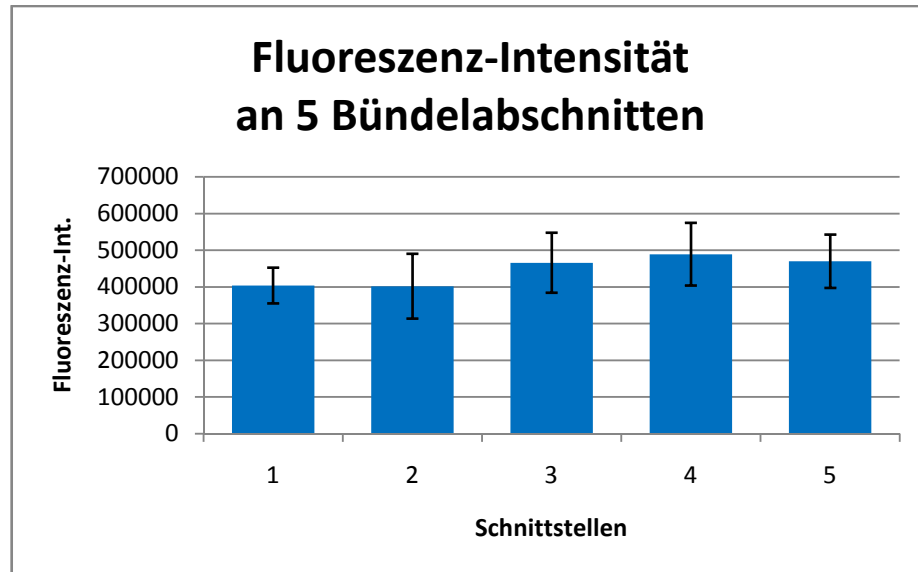


Abbildung 37: Signalintensität an 5 Bündelabschnitten (1-5);
jeweils ist der Mittelwert der einzelnen Fluoreszenzintensitäten dargestellt

In die Mittelwertbildung werden je Objektträger mindestens 12 Positivsignale einbezogen. Wie die Abbildung verdeutlicht, ergeben sich die Signale für alle 5 Schnittstellen in der gleichen Höhe mit geringer Fehlerbreite. Dadurch wird die zu erwartende Homogenität innerhalb eines Faserbündels untermauert.

3 Substanzbibliothek

Für ein kompatibles Verfahren zur Entdeckung bisher unbekannter Bindungspartner wird eine neue Molekülbibliothek synthetisiert und getestet. Prinzipiell können dafür verschiedene Substanzklassen hergestellt werden, wie z. B. Nukleinsäuren, Peptide oder kleine organische Moleküle. Gefundene Binder könnten dabei das Potential für eine diagnostische Verwendung aufweisen. Ein Format für entsprechende, medizinische Bindungstests solcher diagnostischer Sonden stellt der Faden-Array dar. Durch die Präsentation von nur wenigen benötigten Sonden können auf diese Weise Biomarker nachgewiesen werden. Neben der Interaktion von bereits bekannten Molekülen könnte so außerdem eine Funktionalität des Faden-Arrays zusätzlich über die neu entdeckten Bindungspartner aufgezeigt werden. Als Muster soll hier die Verwendung von kleinen organischen Molekülen dienen.

Ein Beispiel für kleine organische Substanzen von großer biologischer Verbreitung sind die Purine. Purine nehmen nach Schätzungen für 4-7 % aller im humanen Genom codierten Proteine eine Schlüsselrolle ein, wo sie als Cofaktoren wie z. B. NADP, GTP oder ATP wirken (91). Letzteres stellt ein essentielles Cosubstrat für alle bekannten 518 Proteinkinasen (92) dar. Diese Enzymklasse kommt in nahezu allen Signalprozessen eukaryotischer Zellen vor, wodurch Purinderivaten ein hohes Potential zukommt, als Binder für Kinasen zu agieren und den Ablauf entsprechender Signalprozesse zu modulieren. Neben der bekannten physiologischen Wirksamkeit von natürlichen Substanzen wie Koffein, werden Purinderivate auch synthetisch hergestellt und teilweise als Arzneistoffe eingesetzt (*Abbildung 38*). So findet Azathioprin Verwendung als Immunsuppressivum (93), Aciclovir oder auch Cladribin wirken als Virostatika bei viralen Infektionen (91).

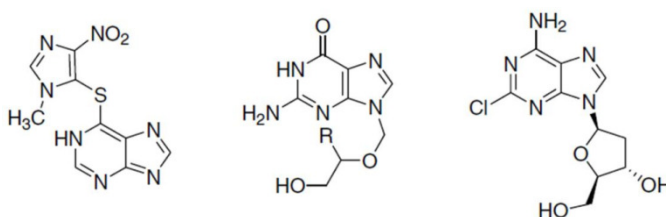


Abbildung 38: Arzneimittel auf Purinbasis; von links nach rechts: Azathioprin, Aciclovir, Cladribin

Ziel ist deshalb die kombinatorische Erstellung einer Bibliothek von einigen hundert Purinderivaten. Zum Auffinden von Bindern wird die Bibliothek anschließend durch Proteinbindungstests gegen verschiedene Kinasen getestet. Werden dabei neue Bindungspartner gefunden, können die entsprechenden Purine als Sonden auf Lyocellfäden immobilisiert, und der Proteinbindungstest auf dem Format des Faden-Arrays wiederholt werden.

Die Kinasebindungstests zur Findung von Bindungspartnern sollen an Mikroarrays auf Glasobjektträgern durchgeführt werden. Für deren Erzeugung werden die entsprechenden Purine zuvor an Cellulose synthetisiert. Die feste Phase wird nach dem dafür entwickelten SC²-Verfahren mit der daran immobilisierten Substanz aufgelöst. Eine vorherige Generierung der Purinbibliothek soll daher nach der SPOT-Methode auf Cellulose durchgeführt werden.

Die zu synthetisierenden Verbindungen sollen sich lediglich in ihren Resten *R* unterscheiden, den Diversitätspunkten. *Abbildung 39* zeigt das allgemeine Zielmolekül, ein 2,6,9-trisubstituiertes Purin.

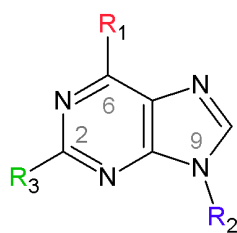


Abbildung 39: 2,6,9-trisubstituiertes Purin

Zu Beginn muss für die Generierung der Bibliothek eine Synthesestrategie konzipiert werden. Anschließend werden die Reaktionsbedingungen für ein repräsentatives Purinderivat als Einzelsynthese ausgetestet und optimiert. Die Bibliothekssynthese soll dann unter Verwendung der optimierten Bedingungen über einen kombinatorischen Ansatz durchgeführt werden. Einen retrosynthetischen Weg zeigt *Abbildung 40*.

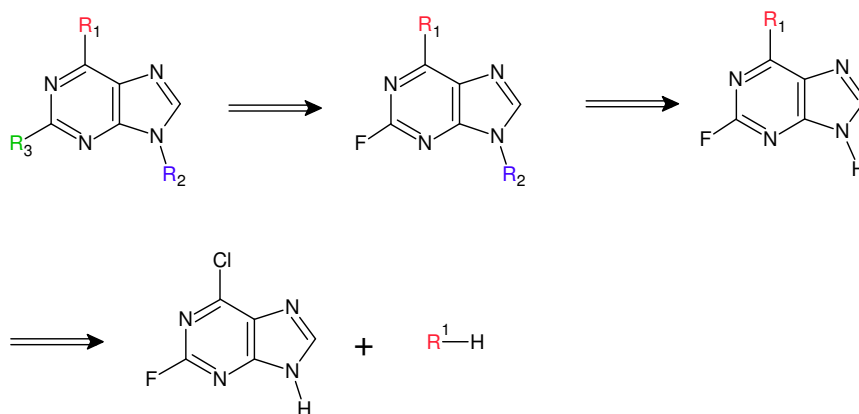


Abbildung 40: retrosynthetischer Ansatz zur Synthese 2,6,9-trisubstituierter Purine

Dabei soll der Rest *R*₁ durch eine Aminosäure definiert sein, über welche die indirekte Verknüpfung an die Cellulosemembran durch eine Peptidbindung stattfindet. Ein Chloraustausch führt dann zur Kopplung des Puringrundgerüsts an die immobilisierte Aminosäure. Der Rest *R*₂ steht für eine Benzylkomponente. Diese kann durch eine Benzylierung an der N-9 Position eingeführt werden. Den dritten Diversitätspunkt (*R*₃) repräsentiert ein Amin, dessen Bindung über eine nucleophile aromatische Substitution des Fluoratoms erfolgen soll.

Wissing et al. konnten zeigen, dass eine Immobilisierung eines trisubstituierten Purins über die C-6 Position nicht zu einem Verlust der Kinasebindung führt (94). Daher soll die kovalente Kopplung der hier herzustellenden Purine an die feste Phase über die Aminosäure R_1 erfolgen.

3.1 Optimierte Einzelsynthese von 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin

Die Synthese einer Verbindungsbibliothek nach kombinatorischem Ansatz erfordert Reaktionsbedingungen, die repräsentativ für jedes Molekül gelten. Daher werden an Hand eines stellvertretenden Moleküls diese Bedingungen zunächst ermittelt. Diese Durchführung wird hier als Einzelsynthese bezeichnet. Als Diversitäten werden Substituenten ausgewählt, die weder zusätzliche elektronenschiebende, noch elektronenziehende Gruppen enthalten. Als Modellsubstanz wird 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin (*Abbildung 41*) synthetisiert.

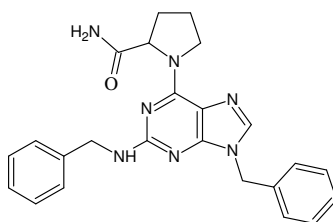


Abbildung 41: Modellsubstanz: 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin

In diesem Kapitel (3.1) werden zuerst die erarbeiteten und letztendlich verwendeten Reaktionsbedingungen vorgestellt.

Die einzelnen Optimierungsprozesse jedes Reaktionsschrittes finden sich in *Kapitel 3.2*.

Für die Synthesestufen in der Einzelsynthese werden die in *Abbildung 42* dargestellten Bezeichnungen eingeführt. Der Index AS kennzeichnet dabei die eingesetzte Aminosäure (z. B. *ES.1_{Phe}*)

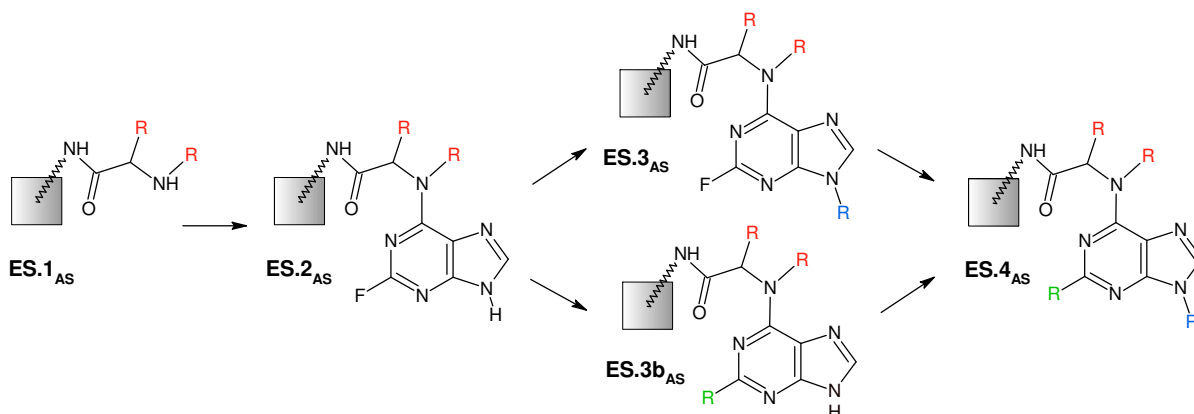


Abbildung 42: Bezeichnungen der Celluloseträger in der Einzelsynthese

3.1.1 Kopplung des Fmoc-Rink Linkers an Celluloseträger

Die Kopplung wird an aminopegylierter Cellulosemembran durchgeführt und erfolgt analog Kap. 2.1.4.1 über ein Rink Linker Molekül. An diesem kann das Produkt im sauren Milieu jederzeit vom Träger abgespalten und anschließend analytisch charakterisiert werden. Die ursprüngliche Carboxylgruppe der eingesetzten Aminosäure ergibt dabei ein Säureamid (vgl. Abbildung 26, Kap. 2.1.4.1). Der Einfachheit halber werden in dieser Arbeit die Substanznamen unter Vernachlässigung der Amidbildung durch die Abspaltung am Rink Linker wiedergegeben. Zunächst werden 96 Träger von je 1 cm² Fläche mit Fmoc-Rink Linker beladen. Für einen quantitativen Umsatz wird ein achtfacher Überschuss gegenüber den Aminogruppen auf der Cellulose eingesetzt, um die Produktbildung zu beschleunigen. Durch Zugabe von DIC bildet die Carboxylgruppe zunächst ein O-Acylisoharnstoffderivat, welches durch Pfp zum Pentafluorophenylester aktiviert wird (95). Ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe des Trägers an die Carbonylgruppe ergibt unter Freisetzung von Pentafluorophenol eine Peptidbindung. Die Lösung wird außerdem mit BPB/DMF versetzt, um über die Abnahme der erhaltenen Blaufärbung des Trägers den Fortschritt der Reaktion anzuzeigen. Eine Beladungsbestimmung wird über die abschließende Abspaltung der Fmoc Schutzgruppe (vgl. Kap. 5.3.9) durchgeführt und ergibt Werte im Bereich von 0,6-0,7 µmol/cm². Diese liegen damit etwas über der vom Hersteller angegebenen Mindestbeladung (0,6 µmol/cm²) der Cellulose mit Aminogruppen. Der Reaktionsumsatz liegt somit nahe 100 %.

3.1.2 Kopplung von Fmoc-Aminosäuren an Celluloseträger

Durch Variation der an den Rink Linker gebundenen Aminosäure soll der 1. Diversitätspunkt (R_1) in der späteren Bibliothekssynthese dargestellt werden.

Zu einer Lösung von Fmoc-AS und HOBt in NMP wird zur Aktivierung DIC gegeben. Der durch DIC gebildete O-Acylisoharnstoff neigt zu Umlagerung und Racemisierung, daher soll dieser durch HOBt abgefangen werden. So entsteht die eigentliche reaktive Spezies, der Fmoc-AS-OBt-Ester. Die Lösung wird dann auf 1 cm² Linker haltigen Träger in einem Volumen gegeben, welches dieser gerade aufnehmen kann (25 µl). Eingesetzt wird ein achtfacher Überschuss, um die Reaktion zu beschleunigen. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Dabei greift die Aminogruppe des Rink Linkers nucleophil an der aktivierten Carbonylgruppe an. Unter Abspaltung von HOBt entsteht das Fmoc geschützte Produkt. Die Reaktionslösung enthält außerdem BPB, welches die Abnahme reagierender Aminogruppen durch eine Farbabnahme anzeigt. Nach dem Blockieren nicht umgesetzter Aminogruppen (*Kap. 5.3.7*) und anschließender Aufarbeitung (*Kap. 5.3.5*) wird die Konzentration der gekoppelten Aminosäure über die Abspaltung der Fmoc Schutzgruppe nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.9*) bestimmt. Die Kopplungsausbeuten befinden sich bei den erhaltenen Celluloseträgern *ES.1_{AS}* im Bereich von 0,58 bis 0,65 µmol/cm² Träger, und zeigen damit Ausbeuten der Kopplung an den Rink Linker von nahe 100 % an. Der Celluloseträger bleibt farblich unverändert (weiß).

3.1.3 Kopplung des Puringrundgerüsts an eine Aminosäure

Die Kopplung des Puringrundgerüsts an einen Träger *ES.1* kann entsprechend dem retrosynthetischen Ansatz (*Kap. 3*) über eine nucleophile aromatische Substitution (S_NAr) durchgeführt werden. Dazu wird 2-Fluoro-6-chloropurin eingesetzt. Von dieser Substanz ist bekannt, dass über einen nucleophilen Angriff durch Amine unter milden Bedingungen zunächst das Chloratom substituiert wird, während der Austausch eines Halogenatoms an der C-2 Position nur schwierig durchführbar ist. Dies ist sowohl für Flüssigphasen- (96) als auch Festphasenreaktionen (97) gezeigt worden. Demnach kann die Kopplung hier selektiv an der C-6 Position durchgeführt werden. *Abbildung 43* zeigt die Reaktion am Beispiel der Aminosäure Prolin.

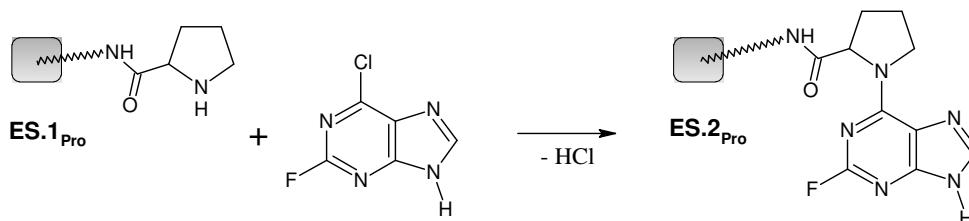


Abbildung 43: Kopplung des Puringrundgerüsts an *ES.1_{Pro}*

Die Substitution wird sowohl an Phenylalanin, als auch an Prolin getestet. Nach der Optimierung (*Kap. 3.2.1*) ist eine schnelle und annähernd quantitative Kopplung des Puringrundgerüsts an den Träger *ES.1* erzielt worden. Dazu wird einerseits das

2-Fluoro-6-chloropurin in sehr hohem Überschuss gegenüber der Aminosäure auf dem Träger (1 cm²) eingesetzt. Andererseits wird die Reaktion bei 160 °C in der Mikrowelle nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.4*) durchgeführt. Die Reaktionsdauer beträgt so nur 15 min. Seit GEDYE (98) und GIGUERE 1986 (99) erstmals von der Synthesebeschleunigung durch Mikrowellennutzung berichteten, findet die Reaktionsführung in Mikrowellengeräten in der organischen Synthese zunehmende Verwendung (100). Das Erhitzen mittels Mikrowellen ist besonders für die kombinatorische Festphasensynthese von Vorteil (100), wie z. B. bei der hier angewendeten Reaktion an Celluloseträgern auf Weflonplatten (*Kap. 5.3.4*; siehe auch (101)). Als Lösemittel wird bei dieser Reaktion das DMSO verwendet. Gerade beim Erhitzen in der Mikrowelle (100) und bei den hier verwendeten geringen Volumina (25 µl) kann es zu einem schnellen Verdampfen des Lösemittels kommen, daher ist die Verwendung einer entsprechend hochsiedenden Flüssigkeit notwendig. Weiterhin besitzt DMSO als polare Substanz eine sehr gute Absorptionsfähigkeit gegenüber Mikrowellen (100). Der gelben Reaktionslösung wird außerdem ein Äquivalent Essigsäure gegenüber den Aminogruppen hinzugegeben, da die Substitution an C-6 nach HE et al. unter sauren Bedingungen am effizientesten verläuft (102). In dieser Arbeitsgruppe ist die Kopplung von Aminen an 2,6-Dichloropurin unter ähnlich schnellen Bedingungen in der Mikrowelle, allerdings in flüssiger Phase, durchgeführt worden. Bisher sind unter thermischem Erhitzen (60 °C) ansonsten mehrere Stunden für entsprechende Reaktionen notwendig (96; 97). Für eine Blockierung werden nicht umgesetzte Aminosäuren gecappt (*Kap. 5.3.7*). Eine Acetylierung an der N-9 Position des Purins findet dabei laut LC/MS Analytik nicht statt. Die Aufarbeitung der erhaltenen Celluloseträger *ES.2* erfolgt nach *Kapitel 5.3.5*.

Charakterisierung:

Der Träger *ES.2_{Pro}* bzw. *ES.2_{Phe}* wird jeweils als leicht gelblich erhalten. Das Produkt wird vom Träger abgespalten (*Kap. 5.3.10 & 2.1.4.1*) und per LC/MS (APCI) analysiert (*Abbildung 44*). Entsprechend der geringeren Polarität durch den aromatischen Rest ergibt sich im ersteren Fall eine höhere Retentionszeit (6,0 min) gegenüber der Prolin haltigen Verbindung (2,9 min). Die Chlorsubstitution an C-6 findet selektiv statt. Die Abwesenheit eines Eduktpeaks zeigt indirekt einen nahezu quantitativen Umsatz an. Die erhaltenen Massen von ($M+H^+$) = 301,4 bzw. 251,1 entsprechen den berechneten. Gefundene Fragmentationen ergeben sich aus der Abspaltung von Amino- (m/z = 284,3 bzw. 234,3) und Amidgruppe (m/z = 256,2 bzw. 206,2) der Produkte.

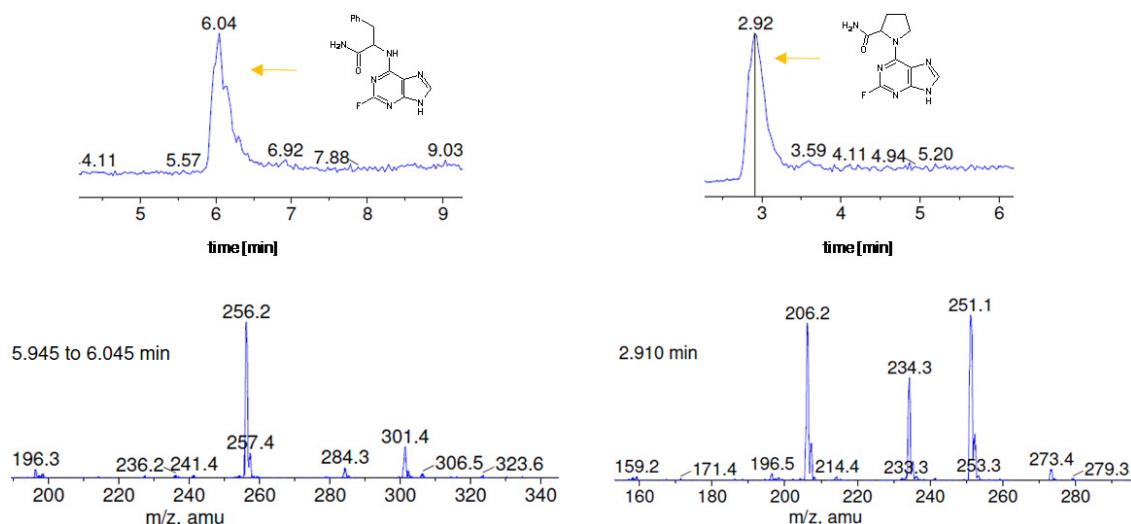


Abbildung 44: Produkt der Purinkopplung an Phe (links) und Pro (rechts); dargestellt sind jeweils Struktur und LC/MS-Analytik (Ionenspur und Massen der Produktpeaks)

3.1.4 Derivatisierung der N-9 Position des Puringrundgerüsts

Durch Variation des an die N-9 Position gebundenen Benzylrestes soll der 2. Diversitätspunkt (R_2) in der späteren Bibliothekssynthese dargestellt werden. Die N-9 Position des Träger gebundenen Purins an *ES.2* kann über einen nucleophilen Angriff an Benzylbromid als Elektrophil entsprechend derivatisiert werden (*Abbildung 45*). Dabei wird Bromwasserstoff freigesetzt.

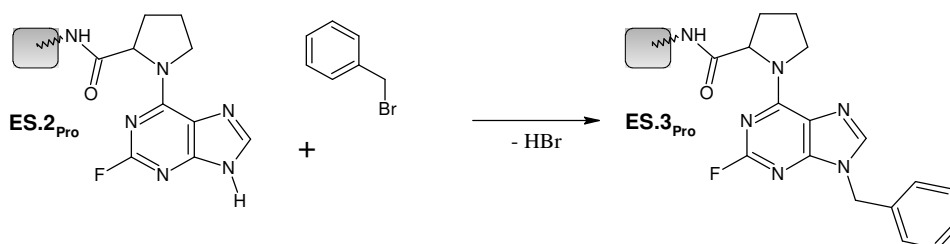


Abbildung 45: Benzylierung eines Purins an der N-9 Position

Um dadurch eine Protonierung des Linkermoleküls durch die entstehende Säure, also eine Produktabspaltung zu vermeiden, und andererseits die Nucleophilie des Purins zu erhöhen, enthält die Reaktionslösung 1,7 Äquivalente einer starken Base (DMAP). Für eine beschleunigte Reaktion wird das Benzylbromid in sehr hohem Überschuss eingesetzt und die Reaktion in der Mikrowelle bei 160 °C durchgeführt. Zur Aktivierung des Bromids wird zu der Lösung Tetrabutylammoniumiodid gegeben. Für einen quantitativen Umsatz ist hier ein etwa 4-facher Überschuss gegenüber dem Purin nötig. Ein nur äquimolarer Einsatz resultiert in einer verminderten

Ausbeute (s. Kap. 3.2.2.3). Als hochsiedendes polares Lösemittel dient NMP. Die Reaktionsdauer von 75 min wird in 5 Schritte zu 15 min unterteilt. Jedes Mal werden erneut 25 µl der Reaktionslösung auf den Celluloseträger gegeben, da ansonsten Lösemittel und Edukt bis zur Trockne des Trägers verdampfen, wodurch die Reaktion limitiert würde.

Charakterisierung:

Die feste Phase *ES.3_{Pro}* wird als hellbraun (*Abbildung 46, a*) erhalten. Das Produkt (*Abbildung 46, b*) wird vom Träger abgespalten und per LC/MS (APCI) analysiert. Der Hauptpeak zeigt das Produkt bei 9,0 min und beschreibt damit einen sehr hohen Reaktionsumsatz (*Abbildung 46, c*). Auf Grund der Kopplung der unpolaren Benzylgruppe ist die Retentionszeit gegenüber dem Edukt erhöht. Die berechnete Quasimolekülmasse entspricht der gefundenen Masse von $(M+H^+) = 341,0$. Die erhaltenen Fragmentmassen (*Abbildung 46, d*) stimmen mit der Abspaltung von Amino- ($m/z = 324,5$) und Amidgruppe ($m/z = 296,2$) überein. Als kleine Schulter ist dabei noch ein Rest des Eduktes bei 2,9 min zu erkennen (*Abbildung 46, c*). Sehr kleine Peaks bei 7,2 min und 9,5 min können nicht zugeordnet werden. Bei 4,7 min ergibt sich ein Peak, dessen zugehörige Molekülmasse als auch die Fragmentionen je um 2 Einheiten kleiner sind als die des erzielten Produktes. Möglich ist hier ein Austausch des Fluoratoms (C-2) durch Wasser aus der Umgebung. Eine entsprechende Hydrolyse in geringem Maße durch die harten Reaktionsbedingungen in der Mikrowelle ist bereits bekannt (103). Das Nebenprodukt kann auf Grund des geringen Anteils jedoch vernachlässigt werden.

N-7-/N-9 unsubstituierte Purine unterliegen einer 7H-/9H-Tautomerie. Sollten sich die Retentionszeiten der daraus erhaltenen N-7 bzw. N-9 benzylierten Isomere überlagern, kann eine Unterscheidung beider Substanzen per LC/MS nicht getroffen werden. Peaks verschiedener Retentionszeiten bei gleicher Masse werden hier in keinem Fall erhalten. Die Substitution durch N-7 ist aus sterischen Gründen unwahrscheinlich und wird laut Literatur (96; 104) im Falle von aminierten C-6 Positionen nicht beobachtet.

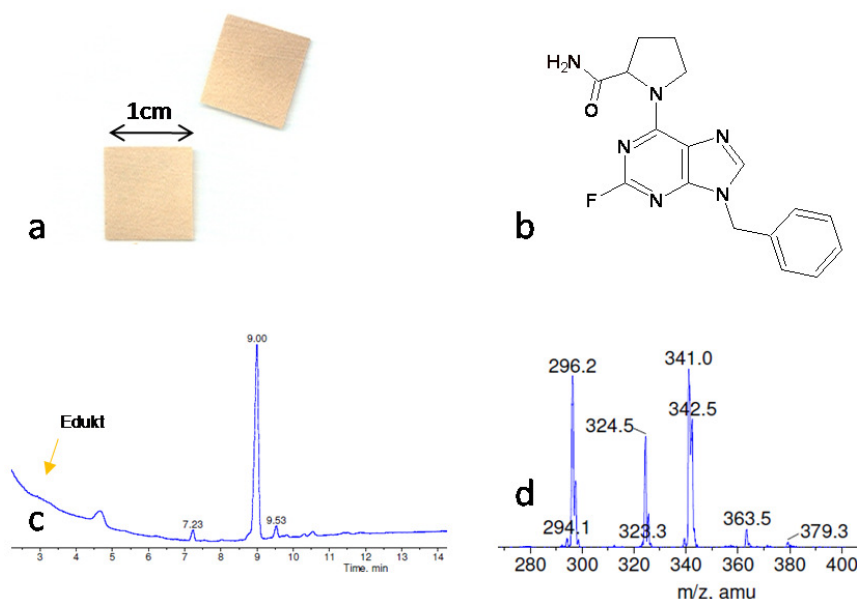


Abbildung 46: 9-Benzyl-2-fluoro-6-prolinylpurin, a: substanzhaltige Träger (1 cm²); b: Molekülstruktur; c: LC/MS (UV-Spur); d: LC/MS (Massendetektion bei 9,0 min)

3.1.5 Derivatisierung der C-2 Position des Puringrundgerüsts

In der späteren Bibliothekssynthese soll der 3. Diversitätspunkt (R_3) durch eine Variation des an C-2 gekoppelten Amins dargestellt werden.

Für die Modellsynthese wird Benzylamin durch eine Fluorsubstitution an C-2 des Puringrundgerüsts eingeführt. Somit wird 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin (Abbildung 47) an der festen Phase synthetisiert ($ES.4_{Pro}$).

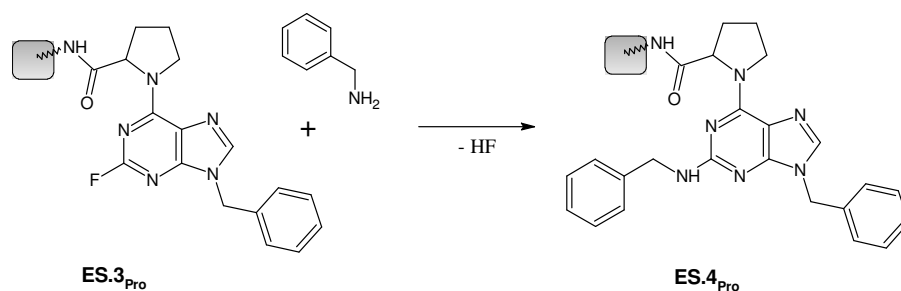


Abbildung 47: Benzylaminierung eines Purins an der C-2 Position

Während die Chlorsubstitution an C-6 des Purins bereits unter milden Bedingungen abläuft (Kap. 3.1.3), sind für einen Austausch an C-2 hohe Temperaturen und längere Reaktionszeiten erforderlich. Das nucleophile Amin wird auf Grund der Trägheit dieser Reaktion (97; 96) im 200-fachen Überschuss eingesetzt. Für eine zusätzliche Erhöhung der Nucleophilie wird die starke Base DMAP hinzugegeben, die außerdem den entstehenden Fluorwasserstoff deprotoniert. Als hochsiedendes

Lösemittel dient NMP, welches in einem Verhältnis von etwa 1:1 (v/v) gegenüber dem Amin eingesetzt wird. Diese Konstellation von NMP und Amin ist innerhalb einer beschriebenen Flüssigphasensynthese als günstigste ermittelt worden (96). Für eine gute Ausbeute sind mit der dort verwendeten, konventionellen Erhitzung jedoch typische 24-40 h Reaktionszeit bei 135 °C nötig. Hier wird für einen nahezu quantitativen Umsatz der Celluloseträger bei 170 °C für 2,5 h in der Mikrowelle erhitzt. Die Dauer wird in 5 Schritte von je 30 min unterteilt, wobei je 25 µl Reaktionslösung neu auf den Träger gegeben werden, um ein vollständiges Verdampfen der Flüssigkeiten zu vermeiden. Eine ähnlich schnelle Durchführung der C-2 Substitution ist bisher bei 200 °C und 30 min in der Mikrowelle gelungen (97). Als feste Phase sind dort Polystyrolharze eingesetzt worden. Für die entsprechende Durchführung ist jedoch die Verwendung von Überdruckgefäßen beschrieben, durch welche sich Handhabung und technische Voraussetzungen verkomplizieren.

Charakterisierung:

Die Farbe des Celluloseträgers hellt sich auf, *ES.4_{Pro}* wird als ockergelb erhalten. Der Hauptpeak des Chromatogramms ergibt sich bei einer Retentionszeit von 9,2 min und entspricht dem in *Abbildung 48* gezeigten Zielprodukt. Die Retentionszeit hat sich damit gegenüber dem Edukt (9,0 min, s. *Kap. 3.1.4*) kaum erhöht. Folglich erhöht sich die Polarität des Moleküls durch die Benzylaminierung an C-2 geringfügig. Die berechnete Masse stimmt mit der gefundenen ($(M+H^+) = 428,2$) überein (*Abbildung 48*, rechts). Als Fragmentierungen werden die Abspaltung der Amino- ($m/z = 411,3$) und der Amidgruppe ($m/z = 383,5$) beobachtet. Geringe Mengen des vermutlich an C-2 hydrolysierten Moleküls, welches schon in der vorigen Reaktionsstufe (*Kap. 3.1.4*) vorhanden war, bleibt bei einer Retentionszeit von 4,7 min unverändert erhalten (*Abbildung 48*, mitte). Die entsprechende Substanz geht folglich keine Reaktion unter den ausgeführten Bedingungen ein. Weiterhin wird ein Peak geringer Größe bei 5,5 min erhalten. Dieser entspricht dem an N-9 nicht benzylierten Nebenprodukt (2-Benzylamino-6-prolinylpurin), welches aus dem in der vorigen Stufe nicht umgesetzten Edukt (*ES.2_{Pro}*, $R_t = 2,9$ min, *Kap. 3.1.4*) entsteht. Bei einer Retentionszeit von 9,9 min ergibt sich ein weiterer Peak, der jedoch eine sehr viel geringere Intensität aufweist. Das entsprechende Ion besitzt eine um eine Einheit höhere Masse als die berechnete Produktmasse, jedoch die gleichen Tochterionen. Es ist demnach anzunehmen, dass ein geringer Anteil des abgespaltenen Zielproduktes einer Amidhydrolyse ausgesetzt ist und entsprechend bei der Fragmentierung im Massenspektrometer eine Abspaltung von -OH anstatt einer Aminogruppe stattfindet.

Die Masse des Eduktmoleküls (bei 9,0 min) wird nicht mehr gefunden, daher kann von einem nahezu quantitativen Umsatz ausgegangen werden.

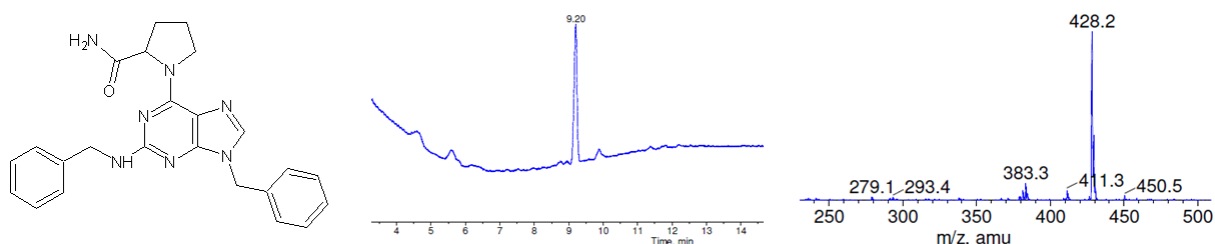


Abbildung 48: 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin; links: Struktur, mitte/rechts: LC/MS Analytik (UV-Spur und Massendetektion bei 9,2 min)

3.2 Optimierung der Einzelsynthese

Während die Kopplung von Rink Linker und Aminosäuren an membranförmige Cellulose Routinereaktionen darstellen (39; 40), müssen alle weiteren Schritte zur Synthese 2,6,9-trisubstituierter Purine untersucht und optimiert werden.

3.2.1 Optimierung der Purinkopplung an ES.1

Für die Optimierung wurde zunächst die Purinkopplung an Träger gebundenem Phenylalanin (*ES.1_{Phe}*) als Aminosäure ausgewählt. Phe weist keine Funktionalitäten am Aminosäurerest auf, so dass dieser gegenüber Folgereaktionen inert ist. Zunächst werden die für eine Flüssigphasenreaktion beschriebenen Bedingungen (102) getestet, wobei die Durchführung hier für 12 min bei 150 °C in der Mikrowelle erfolgt. Als Lösemittel wurde hier Dioxan eingesetzt, obwohl dessen Siedepunkt von 101 °C weit überschritten wird. Zum Vergleich wird das Lösemittel durch höher siedendes DMSO (189 °C) ausgetauscht. Außerdem wird die Reaktion in beiden Lösemitteln auch bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. In allen Fällen wird ein Äquivalent Essigsäure gegenüber der Aminosäure auf der Cellulose zugegeben, was die Effizienz der Chlorsubstitution an der C-6 Position erhöhen soll (102). Das 2-Fluoro-6-chlorpurin wird zunächst in 8-fachem Überschuss eingesetzt. In allen Fällen zeigt sich per LC/MS Analytik neben dem Produkt ein Teil nicht umgesetzten Eduktes. Die höchste Reinheit wird über die Mikrowellenreaktion in DMSO erzielt. Entsprechend wird die Purinkonzentration in DMSO schrittweise erhöht, bis der Einsatz eines über 80-fachen Überschusses zu einer quantitativen Umsetzung führt. Trotzdem werden Temperatur und Reaktionsdauer ein wenig erhöht (15 min, 160 °C). So soll eine hohe Effizienz auch bei evtl. weniger nucleophilen Aminosäuren in der späteren Bibliothekssynthese erzielt werden.

3.2.2 Optimierung der Substitutionen an N-9 und C-2

Die Substitutionen an den Positionen N-9 und C-2 des an der festen Phase *ES.2* gekoppelten Puringrundgerüsts können prinzipiell in verschiedener Reihenfolge durchgeführt werden (vgl. *Abbildung 42*, *Kap. 3.1*). Beide Optionen werden unter Verwendung von Phenylalanin bzw. Prolin als an C-6 gebundene Aminosäure untersucht. Die Derivatisierung an N-9 erfolgt durch nucleophile Substitution an Benzylbromid (*Abbildung 45*, *Kap. 3.1.4*), während der Fluor-Austausch an C-2 über eine nucleophile aromatische Substitution durch Benzylamin stattfindet (*Abbildung 47*, *Kap. 3.1.5*).

Die optimierten Bedingungen für die Derivatisierungen werden in *Kapitel 3.1* beschrieben.

3.2.2.1 Substitution an N-9 vor C-2 mit Phe als Aminosäure

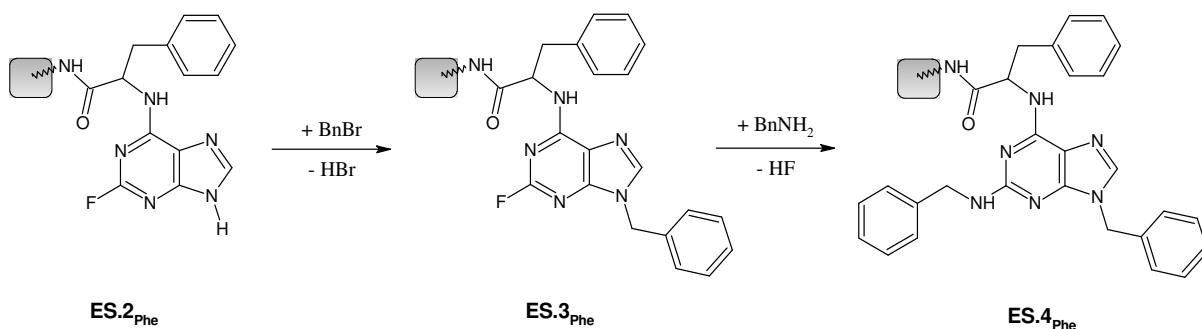


Abbildung 49: Derivatisierung am Puringrundgerüst: Substitution an Position N-9 vor der Substitution an C-2

N-9 Benzylierung:

Verschiedene Konstellationen der Reaktionsparameter werden untersucht. Einen Überblick gibt *Tabelle 6*. Zu Anfang werden die für eine vollständige Kopplung des Purins an die Aminosäure gefundene (*Kap. 3.2.1*) Temperatur und Reaktionszeit (12 min, 150 °C) verwendet. Auch wird die Benzylierung analog bei Raumtemperatur über Nacht untersucht. Für eine Erhöhung der geringen Nucleophilie der N-9 Position wird der Reaktionslösung eine Base hinzugegeben (96). Hier werden zunächst DIPEA, NaOH und CsCO₃ getestet. Letztere führen in DMSO als Lösemittel durch eine stark exotherme Reaktion in der Mikrowelle zur Verbrennung der Celluloseträger. Das beste Verhältnis von Restedukt zu Produkt ergibt sich laut LC/MS Analytik für die Reaktion mit DIPEA als Base in der Mikrowelle. Grundsätzlich zeigt das Chromatogramm außerdem einen kleinen Peak, der ein doppelt benzyliertes Nebenprodukt beschreibt. Neben der N-9 Position wird folglich auch teilweise der sekundäre α -Stickstoff der Aminosäure (Phe) umgesetzt (*Abbildung 50*).

Tabelle 6: Getestete Reaktionsparameter für die Optimierung der N-9-Benzylierung mit Phe als Aminosäure

T [°C]	t [min]	Lösemittel	n(BnBr) [μmol]	Base	n(Base) [μmol]	Aktivator
150	12	DMSO	9,6	DIPEA	1,2	-
150	12	DMSO	9,6	NaOH	1,2	-
150	12	DMSO	9,6	CsCO ₃	1,2	-
20	ü. N.	DMSO	9,6	DIPEA	1,2	-
20	ü. N.	DMSO	9,6	NaOH	1,2	-
20	ü. N.	DMSO	9,6	CsCO ₃	1,2	-
150	12	DMF	38,4	DIPEA	0,6	KJ
150	12	NMP	38,4	DIPEA	0,6	KJ
150	30	NMP	38,4	DIPEA	0,6	KJ
180	12	NMP	38,4	DIPEA	0,6	KJ
180	5 x 15	NMP	38,4	DIPEA	0,6	KJ

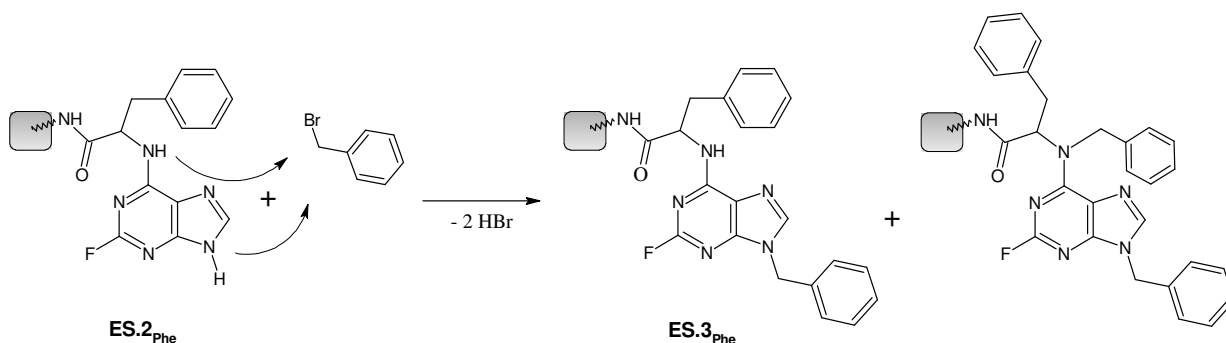


Abbildung 50: Benzylierung an N-9 und der gebundenen Aminosäure (Doppelbenzylierung)

Auf Grund der teilweise zur Verbrennung führenden Verwendung von DMSO werden nun DMF und das homologe NMP als Lösemittel in einer mikrowellenunterstützten Reaktion verglichen. Dabei wird die Konzentration des Benzylbromids erhöht, um das Edukt möglichst vollständig umzusetzen. Als Aktivator des Bromids wird hier Kaliumiodid in katalytischer Menge hinzugegeben. Um die Doppelbenzylierung minimal zu halten, wird jetzt die Base (DIPEA) nur äquimolar eingesetzt. In beiden Lösemitteln werden etwa gleiche Ergebnisse erzielt. Gerade für Mikrowellenreaktionen ist bei entsprechender Temperatur ein möglichst hoher Siedepunkt sinnvoll (100) (vgl. *Kap. 3.1.4*), daher wird für weitere Versuche das höher siedende (Sdp. = 203 °C) NMP verwendet. Um den Reaktionsumsatz zu verbessern, werden separat Dauer und Temperatur erhöht. Bei 30 min, 150 °C vermindert sich der Eduktanteil ein wenig, wodurch jedoch auch der Anteil an Nebenprodukt ansteigt. Bei 5 x 15 min, 180 °C wird zwar das Edukt komplett verbraucht, allerdings ergibt sich jetzt ein gleicher Anteil von doppeltbenzyliertem Nebenprodukt und Zielprodukt.

Ein zufriedenstellender Reaktionsumsatz zu *ES.3_{Phe}* kann auf diese Weise bisher nicht erreicht werden.

C-2 Benzylaminierung:

Obwohl bisher eine Benzylierung an N-9 unter Einsatz von Phe als Aminosäure (C-6) nicht vollständig und sauber durchgeführt werden kann, wird der letzte Derivatisierungsschritt an dem Rohprodukt untersucht. Eingesetzt werden Celluloseträger *ES.3_{Phe}* mit niedrigem Anteil an Doppelbenzylierung, aber entsprechend hohem Anteil an nicht N-9 benzyliertem Restedukt. Eine Fluorsubstitution an 9-Benzyl-2-fluoro-6-phenylalaninylpurin entsprechend *Abbildung 47* (*Kap. 3.1.5*) soll durchgeführt werden. Einen Überblick über die getesteten Reaktionsparameter zeigt (*Tabelle 7*).

HE et al. führten eine analoge Reaktion in flüssiger Phase mit DMSO als Lösemittel bei 180 °C in der Mikrowelle durch (102). Dabei erhielten sie die höchsten Ausbeuten durch Zusatz von einem Äquivalent Tetrafluoroborat gegenüber dem Purin. Unter ähnlichen Bedingungen (jedoch: Festphasensynthese; höhere Aminkonzentration) kann hier im direkten Vergleich durch den Katalysator kein gesteigerter Umsatz erzielt werden. Eine Produktbildung findet laut LC/MS-Analytik kaum statt. In DMSO und NMP als Lösemittel wird eine Substitution bei Raumtemperatur über Nacht getestet. Dabei werden je 100 Äquivalente des Amins gegenüber dem Purin auf dem Träger *ES.3_{Phe}* verwendet. So, als auch in reinem Amin ohne Lösemittel, läuft die Reaktion trotz der sehr hohen Überschüsse kaum ab. Das Gleiche gilt in NMP als Lösemittel bei 150 °C, 12 min in der Mikrowelle. Hier wird DIPEA als Base äquimolar gegenüber dem Purin eingesetzt, um entstehenden Fluorwasserstoff (*Abbildung 47*,

Kap. 3.1.5) abzufangen und somit das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produktes zu verschieben. In Anlehnung an die Literatur (96) wird nun ein 1:1 (v/v) Verhältnis von Benzylamin und NMP als Reaktionslösung getestet. Hier ergibt sich bei höherer Temperatur (170 °C) und längerer Reaktionsdauer (2 x 30 min) der Hauptpeak im Chromatogramm (LC/MS) als Zielprodukt. Der Umsatz zu *ES.4_{Phe}* ist jedoch nicht vollständig. Außerdem ergibt sich das zu erwartende Nebenprodukt aus dem an N-9 nicht benzylierten Anteil. Auch diese Umsetzung ist entsprechend unvollständig.

Tabelle 7: Reaktionsparameter für die Optimierung der C-2 Benzylaminierung mit Phe als Aminosäure

T [°C]	t [min]	Lösemittel	n(BnNH ₂) [μmol]	Base	n(Base) [μmol]	Aktivator
180	5	DMSO	12	-	-	(Bu ₄ N)BF ₄
180	5	DMSO	12	-	-	-
20	ü. N.	DMSO	60	-	-	-
20	ü. N.	NMP	60	-	-	-
20	ü. N.	-	210	-	-	-
150	12	NMP	115	DIPEA	0,6	-
170	2 x 30	NMP	115	DIPEA	1,2	-

Eine weitere Optimierung könnte zu einer vollständigen Fluorsubstitution an C-2 führen (optimierte Bedingungen s. Kap. 3.1.5). Limitierend sind die unvollständige Benzylierung an N-9 und die teilweise Doppelbenzylierung. Daher wird untersucht, ob eine Änderung der Substitutionsreihenfolge zu verbesserten Ergebnissen führt.

3.2.2.2 Substitution an C-2 vor N-9 mit Phe als Aminosäure

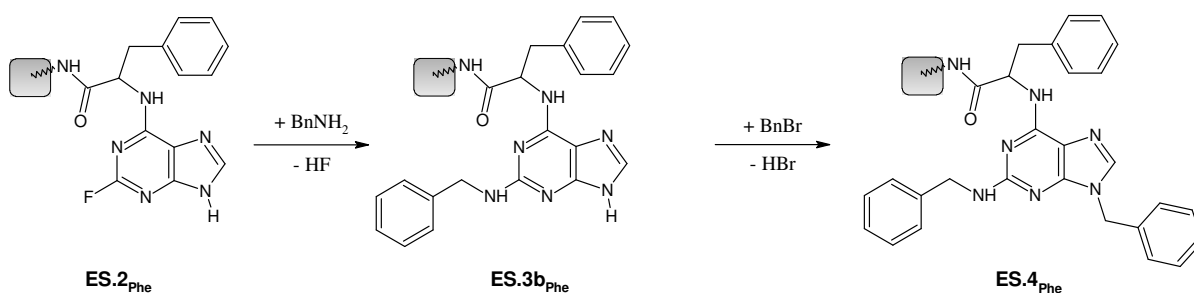


Abbildung 51: Derivatisierung am Puringrundgerüst: Substitution an Position C-2 vor der Substitution an N-9

Da bisher in keinem Fall der N-9-Benzylierung ein annähernd quantitativer Umsatz zum Zielprodukt erreicht werden kann, wird nun die Auswirkung einer vorherigen Substitution an C-2 versucht. Möglicherweise wird durch die Aminierung an C-2 die Reaktivität des N-9 Stickstoffs erhöht.

C-2 Benzylaminierung:

Für die Substitution an C-2 sind bereits moderate Reaktionsumsätze erzielt worden (Kap. 3.2.2.1). Die Reaktion wird dabei in der Mikrowelle für 2 x 30 min bei 170 °C durchgeführt. Die Reaktionslösung enthält 4,6 M Amin (115 µmol) in einer 0,05 M (1,2 µmol) Lösung DIPEA/NMP. Durch schrittweise Wiederholung (2 x, 3 x, 5 x 30 min) der Prozedur kann der Umsatz zu *ES.3b_{Phe}* quasi komplettiert werden. Dabei wird nach jedem Schritt erneut Reaktionslösung (25 µl) auf den Celluloseträger gegeben, um ein vollständiges Verdampfen der Flüssigkeiten zu vermeiden.

Laut AUSTIN et al. (97) ergibt sich für den mikrowellengestützten Halogenaustausch an C-2 des Purins folgende Reaktivitätsabfolge: $I > F > Cl$. Um die nun optimierten aber harten Reaktionsbedingungen zu vereinfachen, wird versucht das Fluoratom vor der Benzylaminierung durch Iod zu substituieren. Dazu werden sowohl Kaliumiodid, als auch Tetrabutylammoniumiodid getestet. Die Salze werden je in bis zu 20-fachem Überschuss eingesetzt. Eine Iodierung läuft laut LC/MS-Analytik jedoch weder bei Raumtemperatur über Nacht, noch in der Mikrowelle (3 x 15 min, 180 °C) ab.

N-9 Benzylierung:

In Kapitel 3.2.2.1 kann gezeigt werden, dass trotz einer unvollständigen Umsetzung des Eduktes eine Doppelbenzylierung stattfindet. Bei geänderter Substitutionsreihenfolge soll hier durch eine reduzierte Konzentration des eingesetzten Benzylbromids (≤ 2 eq) eine Minimierung dieser Nebenreaktion untersucht werden. Weiterhin werden Temperatur und Reaktionsdauer gesenkt. Durchführungen bei 150 °C für 12 min in der Mikrowelle, als auch für 3 bzw. 5 Tage bei 40 °C im Ofen, führen zu einem verringerten Eduktumsatz. Trotzdem wird die Bildung des Nebenproduktes weiterhin beobachtet.

Mitsunobu-Reaktion:

Auf Grund der Bildung eines Nebenproduktes bei einfacher Benzylierung von *ES.3b_{Phe}* wird die Mitsunobu-Reaktion zur Derivatisierung untersucht. Dabei bildet sich ein Addukt aus Phosphan und einem Azodicarboxylat, wobei ein zu alkylierendes Nucleophil deprotoniert wird. Der Alkylrest tragende Alkohol greift das Phosphoniumion an und wird dadurch für eine S_N2-Reaktion mit dem Nucleophil aktiviert (*Abbildung 52*).

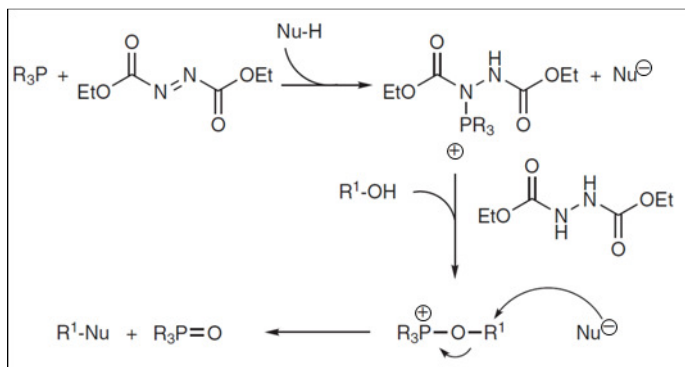


Abbildung 52: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion (105)

Als Nucleophil gilt hier das auf der festen Phase *ES.3b_{Phe}* gebundene Purin. Für die Alkylübertragung werden die Alkohole Diphenylethanol, Benzylalkohol und Isopropanol getestet.

AUSTIN et al. haben über die Mitsunobu-Reaktion eine Isopropanylierung der N-9 Position an einem Syntheseharz als fester Phase durchgeführt (97). Angaben zur Ausbeute sind nicht gemacht worden. Analog zu deren Bedingungen werden hier DIAD, Triphenylphosphan und der entsprechende Alkohol je in 8-fachem Überschuss gegenüber dem gekoppelten Purin eingesetzt. Als Lösemittel werden molsiebgetrocknetes NMP und THF getestet. Untersuchte Reaktionsbedingungen sind 3 x 15 min bei 180 °C in der Mikrowelle, als auch schüttelnd bei Raumtemperatur (1 bzw. 2 d). Nur mit Isopropanol als Alkohol kann hier eine Reaktion beobachtet werden. Der Umsatz zu *ES.4_{Phe}* liegt im besten Fall (RT, ü. N., 1,66 M/THF) bei etwa 50 %. Da die Effektivität der Mitsunobu-Reaktion stark von der sterischen Umgebung der Alkoholgruppe abhängig ist (105), lässt sich eine Inaktivität der beiden anderen Alkohole erklären.

Die Fluorsubstitution an C-2 durch Benzylamin kann hier optimiert werden. Für die Benzylierung an N-9 besteht dagegen eine nur mäßige Umsetzung (Mitsunobu-Reaktion), bzw. es entsteht doppeltbenzyliertes Nebenprodukt bei der Reaktion mit Benzylbromid.

3.2.2.3 Substitution an N-9 vor C-2 mit Pro als Aminosäure

Wie in *Kapitel 3.2.2.1* dargestellt, ergibt sich bei der Benzylierung an N-9 des Purins zusätzlich eine Benzylierung am α -Stickstoff der Aminosäure. Statt der primären Aminosäure Phe wird nun das sekundäre Prolin verwendet. Ein so an *ES.2* erhaltenes, tertiäres Stickstoffatom an C-6 sollte keine nucleophile Substitution mit Benzylbromid eingehen (*Abbildung 53*). Hier wird wieder die ursprüngliche Substitutionsreihenfolge entsprechend der Retrosynthese (*Abbildung 40, Kap. 3*) gewählt.

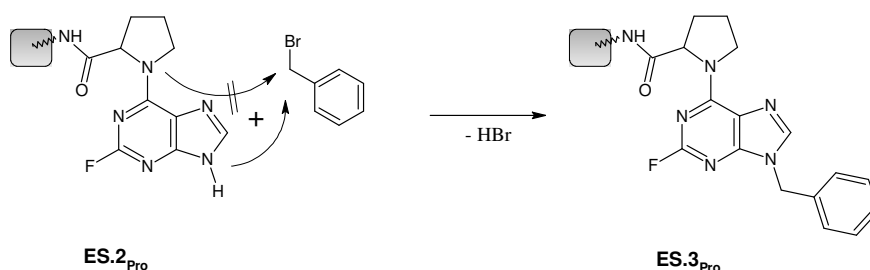


Abbildung 53: Unterdrückung einer Doppelbenzylierung durch Verwendung sekundärer Aminosäuren wie Prolin

N-9 Benzylierung:

Mit Phe als primärer Aminosäure wird bei 5 x 15 min, 180 °C zwar das Edukt komplett verbraucht, jedoch entsteht Nebenprodukt (*Kap. 3.2.2.1*). Nun wird die sekundäre Aminosäure Prolin verwendet. Bei 5 x 15 min, 160 °C wird die Benzylierung an *ES.2_{Pro}* in der Mikrowelle durchgeführt. Auf Grund der niedrigeren verwendeten Temperatur wird eine höhere Konzentration an Bromid eingesetzt. Die Base DIPEA wird ausgetauscht, da deren Siedepunkt (127 °C) unter der Reaktionstemperatur liegt. Stattdessen wird DMAP eingesetzt. Eine Doppelbenzylierung findet wie erwartet nicht statt. Nur ein geringer Anteil an Edukt wird laut LC/MS nicht umgesetzt. Für eine Reaktionsbeschleunigung durch Mikrowellen müssen die Substanzen möglichst polar sein, um die Strahlung zu absorbieren (100). Deshalb werden zwei ionische Flüssigkeiten ([BMIM]PF₆ bzw. [BMIM]OAc) als Lösemittel im Gemisch mit NMP getestet. Ein Restanteil NMP wird verwendet, um die Viskosität der flüssigen Salze zu senken. In beiden Fällen wird kaum Produktbildung beobachtet. Möglicherweise verhindert die Viskosität der Lösemittel einen ausreichenden Stofftransport. Außer über Iodide kann ein eingesetztes Bromid auch über eine Lewis-Säure aktiviert werden. Bei den oben genannten Bedingungen wird die Reaktion mit einem Äquivalent Aluminiumchlorid durchgeführt. Hier wird eine mäßige Ausbeute erhalten. Bei der Analyse über LC/MS ergibt sich zwar das Produkt als Hauptpeak, jedoch werden neben übrigem Edukt noch weitere, nicht charakterisierbare Peaks, erhalten. Als Katalysator wird entsprechend wieder Iodid in äquimolarer Menge (0,6 µmol) eingesetzt. Allerdings

wird statt Kaliumiodid nun Tetrabutylammoniumiodid verwendet. Dieses besitzt eine höhere Löslichkeit in NMP und könnte so zu einer effektiveren Aktivierung führen. Theoretisch sollte ein Einsatz in katalytischen Mengen ausreichend sein. Ein quantitativer Umsatz kann jedoch letztendlich erst durch die Erhöhung der Stoffmenge auf 2,5 μmol Iodid herbeigeführt werden (s. *Kap. 3.1.4*).

Flüssigphasenreaktionen können unter Rühren durchgeführt werden. Dabei können katalytisch eingesetzte Substanzen ausreichend verteilt werden. Bei der mikrowellenunterstützten Reaktion auf Cellulosemembranen fehlt diese Konvektion. Vermutlich steht deshalb bei Einsatz geringer Stoffmengen nicht ausreichend Substanz zur Verfügung, so dass eine Erhöhung der Stoffmenge an Iodid die Effizienz steigert.

C-2 Benzylaminierung:

Bei der umgekehrten Substitutionsreihenfolge (*Kap. 3.2.2.2*) ist die nucleophile aromatische Fluorsubstitution an *ES.2_{Phe}* bereits optimiert worden. Auf Grund des geringen Siedepunktes (127 °C) wird jetzt lediglich die Base DIPEA durch DMAP ersetzt. Die Konzentration der Base wird erhöht. So soll in einer späteren Bibliothekssynthese auch für weniger nucleophile Amine eine ausreichende Reaktivität gewährleistet sein.

Eine optimierte Fluorsubstitution an *ES.3_{Phe}* erfolgt so in der Mikrowelle für 5 x 30 min bei 170 °C. Für eine weitere Versuchsbeschreibung und Charakterisierung siehe *Kapitel 3.1.5*.

Letztendlich werden hier neue, optimierte Reaktionsbedingungen für die Synthese trisubstituierter Purine an membranförmiger Cellulose erarbeitet. Diese sind in *Kap. 3.1* bereits zusammenfassend dargestellt worden. Alle drei Substitutionsschritte an dem eingesetzten Puringrundgerüst werden hierbei mikrowellengestützt auf einer Weflonplatte durchgeführt. Auf diese Weise werden besonders kurze Reaktionszeiten, selbst für den Fluoraustausch an der reaktionsträgen Position C-2 des Purins, erhalten.

3.2.3 Tests weiterer Substituenten

3.2.3.1 Tests verschiedener Aminosäuren für die Modellreaktion

Für die Synthese einer Purinbibliothek soll der Diversitätspunkt R_1 durch verschiedene Aminosäuren repräsentiert werden. Die zehn in *Tabelle 8* gezeigten Substanzen werden hinsichtlich der Herstellung trisubstituierter Purine unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen untersucht. Die Diversitäten R_2 bzw. R_3 werden durch einen unsubstituierten Benzyl- bzw. Benzylaminorest dargestellt.

3. Substanzbibliothek

Tabelle 8: Getestete Aminosäuren an Diversitätspunkt R^1

Abkürzung	Name	Struktur	Produktbildung*	Fmoc-Werte [$\mu\text{mol}/\text{cm}^2$]
D-Tic	3-Carboxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin		(+)	0,68
D-Tpi	3-Carboxy-1,2,3,4-tetrahydronorharman		(-)	0,61
Thioprop	Thioprolin		(-)	0,63
Hyp(tBu)	Hydroxyprolin		(+)	0,69
Cptd	3-Carboxymethyl-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-on		(o)	0,39
Cmpi	4-Carboxymethyl-piperazin		(+)	0,68
PipGly	N-(Boc-4-piperidyl)-glycin		(o)	0,63
-	2-Carboxyl-azetidin		(-)	0,71
MeLeu	N-Methyl-leucin		(+)	0,73
MePhe	N-Methyl-phenylalanin		(+)	0,68

*

+: Sehr hoher Reaktionsumsatz in allen Schritten
o: Produktbildung bei Erhalt uncharakterisierter Nebenprodukte
–: Produktbildung kann nicht nachgewiesen werden

Charakterisierung:

Abgesehen von Cptd ($0,39 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) ergeben sich für alle Aminosäuren hohe Kopplungsausbeuten an den Träger. Aus der Fmoc-Vermessung nach der Entschützung werden Werte von $0,61 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (Tpi) bis $0,73 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (MeLeu) erhalten. Bezüglich der Stoffmenge gebundenen Linkermoleküls (*hier*: $0,75 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) entspricht dies Ausbeuten zwischen 81 % und 95 %. Die Substanzen werden nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.10*) vom Träger abgespalten. Im Falle von Hyp(tBu) findet gleichzeitig eine Entschützung statt. Nach der Charakterisierung per LC/MS zeigen sich zusätzlich zu Prolin an fünf der getesteten Aminosäuren (*Tabelle 8*) sehr gute Umsätze zu den entsprechenden trisubstituierten Purinen. Die Verwendung der übrigen Substanzen führt entweder zu einer Reihe von Nebenprodukten, oder der Umsatz in mindestens einem der Reaktionsschritte ist ungenügend bis gar nicht erkennbar. An D-Tpi findet die Purinkopplung (Bildung von $ES.2_{Tpi}$) nicht statt. Dies lässt sich auf die sterisch anspruchsvolle Struktur zurückführen.

Eine kombinatorische Synthese gilt folglich unter Verwendung von sechs der untersuchten Aminosäuren als vielsprechend.

3.2.3.2 Tests verschiedener Halogenide für die Modellreaktion

Unter Verwendung der optimierten Bedingungen werden einige weitere Halogenide hinsichtlich des Diversitätspunktes R_2 untersucht. Getestet werden 3-Chlorobenzylbromid, Iodheptan, das sekundäre Bromcyclohexan und 4-Chlorophenol als aromatisches Halogenid.

Charakterisierung:

Ein sehr guter Umsatz zum trisubstituierten Purin ergibt sich unter Verwendung von 3-Chlorobenzylbromid (*Abbildung 54*, links). Der Produktpeak aus der LC/MS-Analytik zeigt sich bei einer Retentionszeit von 10,1 min (*Abbildung 54*, mitte). Die detektierte Masse des Quasimoleküls entspricht der berechneten ($(M+H^+) = 462,9$; *Abbildung 54*, rechts). Weiterhin wird das Fragment der Abspaltung der Amidgruppe ($m/z = 417,3$) gefunden. Als getestetes Halogenalkan reagiert Iodheptan trotz der besseren Abgangsgruppe nur mäßig. Dagegen wird sowohl mit Bromcyclohexan, als auch mit 4-Chlorophenol keine Derivatisierung an der N-9 Position beobachtet.

Bei der Durchführung einer kombinatorischen Bibliothekssynthese werden für den 2. Diversitätspunkt (R_2) dementsprechend Derivate des Benzylbromids eingesetzt.

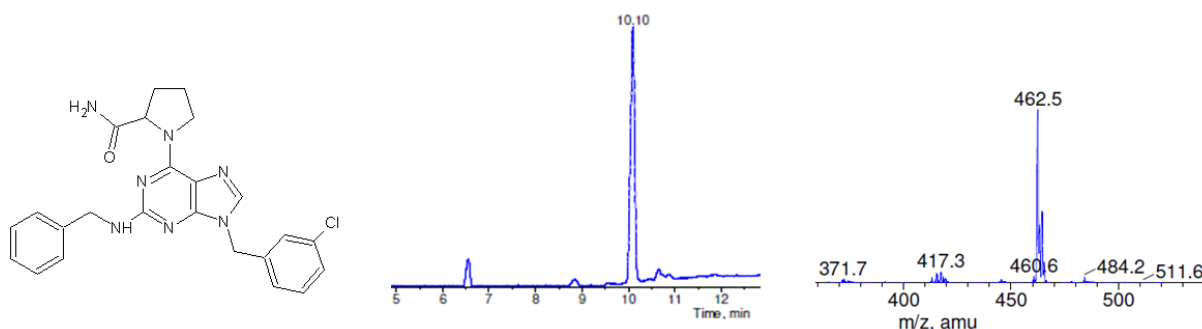


Abbildung 54: links: Struktur von 2-Benzylamino-9-(3-chloro)-benzyl-6-prolinylpurin, mitte/rechts: LC/MS-Analytik (UV-Spur und Massendetektion bei 10,1 min)

3.2.3.3 Tests verschiedener Amine für die Modellreaktion

Für die Modellreaktion ist Benzylamin verwendet worden. Hier soll untersucht werden, ob eine hohe Produktbildungsrate bezüglich der Fluorsubstitution auch mit vergleichsweise elektronenreichen, bzw. elektronenarmen Substanzen erreicht werden kann. Dazu wird die Einzelsynthese nach den optimierten Bedingungen mit 2,3-Dimethoxybenzylamin, bzw. 4-Chlorobenzylamin getestet.

Charakterisierung:

Abbildung 55 zeigt die zugehörigen Chromatogramme der Charakterisierung via LC/MS. Mit beiden Aminen kann demnach eine hohe Produktbildung beobachtet werden. Demnach sind auch elektronenarme Benzylamine wie 4-Chlorobenzylamin ausreichend nucleophil und können in einem kombinatorischen Ansatz verwendet werden.

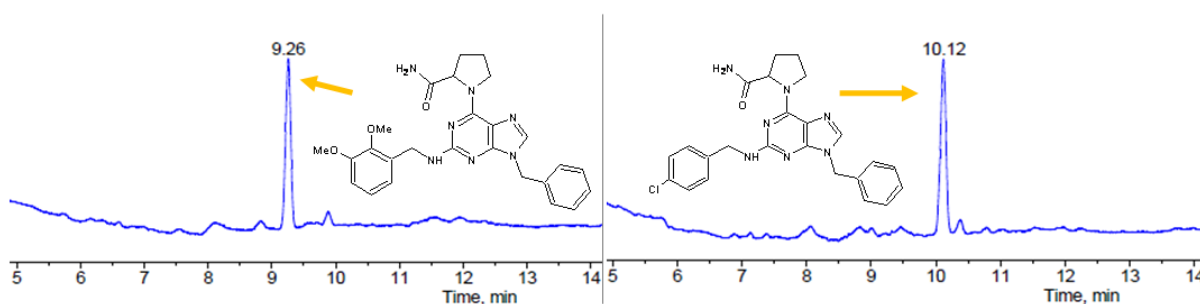


Abbildung 55: LC/MS-Analytik (UV-Spur) trisubstituierter Purine,
links: mit 2,3-Dimethoxybenzylamin an C-2, rechts: mit 4-Chlorobenzylamin an C-2

3.3 Versuch einer Bibliothekssynthese per SPOT-Methode

Die kombinatorische Parallelsynthese kann prinzipiell mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Für eine anschließende Überführung der Bibliothek in das Mikroarray-Format nach dem SC²-Prozess, soll die Synthese hier an membranförmiger Cellulose erfolgen.

Eine häufig verwendete Technik zur Herstellung von Peptidbibliotheken auf Celluloseträgern ist die SPOT-Synthese (39). Auch die Generierung von Substanzsammlungen kleiner organischer Moleküle ist auf diesem Wege durchgeführt worden (60; 101; 61).

Eine Bibliothek von 2,6,9-Trisubstituierten Purinen soll hergestellt werden. Dazu werden 6 Cellulosemembranen (Kap. 5.3.1) verwendet. Auf jedem Blatt wird eine der in der Einzelsynthese als positiv getesteten (Kap. 3.2.3.1) sekundären Aminosäuren immobilisiert (1. Diversitätspunkt). Jedes Blatt soll 384 Spots in 16 Zeilen zu

24 Spalten enthalten (Abbildung 56). Die Spalten werden mit den Zahlen 1-24 bezeichnet, für die Zeilen werden die Buchstaben A-P verwendet. Das Puringrundgerüst wird an jeden aminosäurehaltigen Spot gekoppelt. Entsprechend der 24 Spalten werden dann auf jeder Membran 24 Benzylbromide aufgetragen und gebunden (2. Diversitätspunkt). Analog werden 16 Amine pro Träger auf den 16 Zeilen verteilt (3. Diversitätspunkt). So ergibt sich letztendlich eine Substanzsammlung von $6 \times 24 \times 16 = 2304$ verschiedenen Purinderivaten. Eine 25. Spalte wird für die Synthese von Kontrollsubstanzen benutzt.

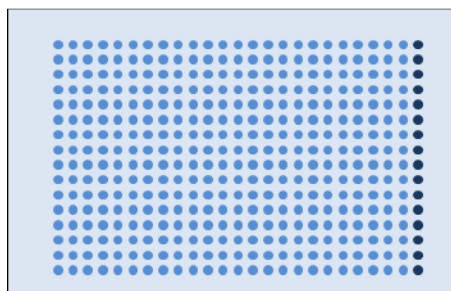


Abbildung 56: Schema einer Spotmembran von 16 x 25 Spots

Während die Substanzen der Bibliothek permanent an die Cellulose gebunden vorliegen, sind die Kontrollsubstanzen über ein Rink Linker Molekül gekoppelt. Für die Charakterisierung können die Kontrollen nachträglich ausgestanzt und so durch die Behandlung mit TFA-Dampf vom Träger abgespalten werden. Die Analytik erfolgt durch die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (HPLC/MS).

3.3.1 Vorbereitungen zur SPOT-Synthese

Für eine Zuordnung werden die Cellulosemembranen von 1-6 durchnummeriert. Verwendet wird mit β -Alanin veresterte, Fmoc geschützte Cellulose. Diese wird vom Hersteller als säurelabil angegeben und ist speziell für die Anwendung im SC²-Prozess entwickelt worden. Vor der Verwendung werden die Schutzgruppen abgespalten. Durch Vermessung der abgespaltenen Fmoc-Gruppe ergibt sich eine Beladung von 1,3-1,5 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$. Auf der Fläche eines Spots von 3,5 mm Durchmesser (Spotfläche: 0,10 cm^2) sind damit mindestens 0,13 μmol Aminogruppen vorhanden.

Jedem Celluloseträger wird anhand der daran gekoppelten Verbindung in der **SPOT**-Synthese eine Bezeichnung zugeordnet (*Abbildung 57*):

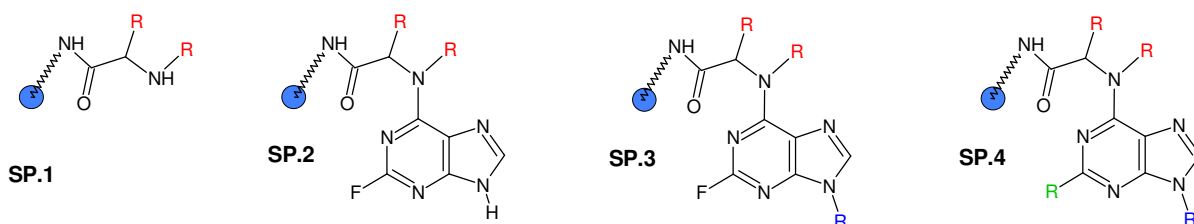


Abbildung 57: Bezeichnung der Celluloseträger in der SPOT-Synthese

3.3.2 Cyclus 0: Spotten von Raster und Kontrollspots

Pro Membran werden 384 Spots erzeugt (*Kap. 5.6.2*). Als Spacermolekül wird Fmoc geschütztes β -Alanin gekoppelt. In Spalte 25 wird stattdessen Fmoc-Rink Linker aufgetragen. Die hier als Kontrollen generierten Verbindungen können nach der Synthese vom Linker abgespalten und analysiert werden.

Die chemische Kopplung beider Substanzen wird analog der in Kapitel 3.1.1 & 3.1.2 erläuterten Technik durchgeführt. Die genaue Durchführung wird in *Kapitel 5.6.2* beschrieben. Das Capping (*Kap. 5.3.7*) der aminosäurehaltigen Membranen wird in diesem Fall über Nacht durchgeführt, da abgesehen von den Spots die gesamte Fläche der Membranen freie Aminogruppen aufweist. Die Spots werden anschließend Fmoc entschützt (*Kap. 5.3.8*) und die freien Aminogruppen per Bromphenolblau (BPB) farblich sichtbar gemacht. Zur Orientierung während der gesamten Synthese werden mindestens alle Eck- und Kontrollspots mit Bleistift umrandet.

3.3.3 Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren an den Membranen

Auf jedes der 6 Blätter wird nun eine der getesteten (*Kap. 3.2.3.1*) 6 Aminosäuren (*Tabelle 9*) in Fmoc geschützter Form auf alle 384 Spots gespottet. Die chemische Kopplung verläuft entsprechend der in *Kapitel 3.1.2* beschriebenen Form. Die Durchführung erfolgt laut *Kapitel 5.6.3*.

Tabelle 9: in der SPOT-Synthese verwendete Aminosäuren (Fmoc geschützt)

Membran Nr.	Aminosäure
1	Cmpi
2	MeLeu
3	MePhe
4	Pro
5	Hyp(tBu)
6	D-Tic

Nach dem Auftragen der Reaktionslösungen ist die Reaktionszeit durch das Verdampfen des Lösemittels begrenzt. Daher wird der Spot-Vorgang zweimal wiederholt. Zwischen den Schritten wird eine Reaktionszeit von 30 min eingehalten. Die Reaktion wird durch Lagern über Nacht bei Raumtemperatur zum quantitativen Umsatz gebracht. Dieser wird durch fast vollständige Entfärbung der Spots sichtbar. Eine weniger ausgeprägte Entfärbung findet im Fall der Aminosäure Fmoc-Cmpi statt. Dies lässt sich mit der in der Struktur vorhandenen (s. *Tabelle 8*) tertiären Aminogruppe (basisch) erklären. Nicht umgesetzte Aminogruppen werden gecappt. Die Aminosäuren werden Fmoc entschützt und die Spots auf dem erhaltenen Träger *SP.1* erneut angefärbt (*Abbildung 58*). Für die Linker gebundenen Kontrollspots (Spalte 25) ergibt sich auf Grund der strukturellen Unterschiede eine leicht verschiedene Blaufärbung gegenüber den β -Ala gebundenen Aminosäuren.

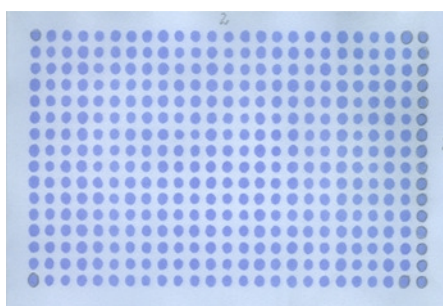


Abbildung 58: Eine der Spotmembranen SP.1 nach Anfärben der entschützten Aminosäuren mit BPB

3.3.4 **Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüsts auf SP.1**

Verwendet werden die ermittelten Reaktionsbedingungen aus der Einzelsynthese (Kap. 3.1.3 & 5.6.4). Jedes Blatt wird separat beladen. Da die Reaktion von 2-Fluoro-6-chloropurin (analog Abbildung 43, Kap. 3.1.3) an die Träger *SP.1* für jede Substanz gleichermaßen stattfinden soll, wird die Reaktionslösung auf der gesamten Membran verteilt. Ein Spotvorgang bräuchte dementsprechend nicht stattfinden. Ein Volumen der Reaktionslösung, welches der Träger gerade aufnehmen kann (2 ml) wird zunächst auf Membran 1 aufgetragen. Dabei befindet sich das Blatt liegend auf einer Weflonplatte (Kap. 5.3.4). Im Testmaßstab der Einzelsynthese wird eine optimierte Reaktion an *ES.1* für 15 min bei 160 °C durchgeführt. Hier dagegen verfärben sich einzelne Bereiche der Membran bereits nach 5 min zunehmend braun und verkleben anschließend mit der Glasabdeckung. Der Träger muss verworfen werden. Membran 2 wird daraufhin für nur 6 min behandelt. Wie in *Abbildung 59* (links) dargestellt, wird auch dieser Träger zerstört und muss verworfen werden.

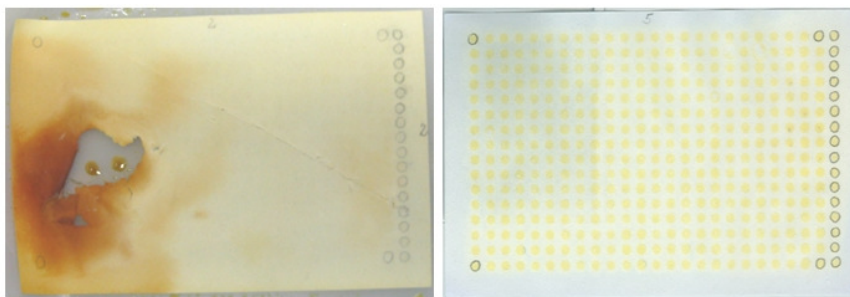


Abbildung 59: Kopplung des Puringrundgerüsts an *SP.1*; links: Befeuchtung der kompletten Membran mit Reaktionslösung, rechts: adressiertes Spotten der Reaktionslösung

Die Membranen 1+2 werden entsprechend den Cyclen 0+1 nachproduziert. Die bei der Reaktion hervorgerufene Erweichung der Cellulosemembran findet im Maßstab der Einzelsynthese an *ES.1* nicht statt. Einerseits wird dort ein anderes Celluloseprodukt (säurestabilisiert) derselben Firma (AIMS Scientific Products) verwendet. Andererseits handelt es sich hier um ein größeres Volumen an Reaktionslösung auf einer größeren Fläche. Dies führt wahrscheinlich zu einer intensiveren Hitzeentwicklung während der Bestrahlung und somit zur Schädigung der Membran.

Die Reaktion an *SP.1* mit 2-Fluoro-6-chloropurin wird nun über den Spotvorgang durchgeführt. So wird das insgesamt pro Membran verwendete Reaktionsvolumen minimiert. Strahlungsabsorbierende Reaktionslösung befindet sich so nur an den Spotpositionen. Zusätzlich wird die Reaktionsdauer weiter auf 4 min gesenkt. Eine Zerstörung der Membranen kann auf diese Weise vermieden werden. Der Vorgang

(inkl. Spotten) wird für jedes Blatt so oft durchgeführt, bis sich die blauen Spots auf dem erhaltenen Träger SP.2 gelb gefärbt haben (*Abbildung 59*, rechts).

An Hand eines Einzelsyntheseversuchs auf einem 1 cm² großen Träger wird der Reaktionsumsatz von *ES.1_{Pro}* zu *ES.2_{Pro}* nach einer Reaktionszeit von 4 min untersucht. Per LC/MS-Analytik kann gezeigt werden (*Abbildung 60*), dass auch bei dieser kurzen Reaktionsdauer eine hohe Produktbildung erfolgt. Ein in geringem Anteil auftretendes Nebenprodukt ($R_t = 4,5$ min) weist eine um 16 Einheiten höhere Masse auf und kann nicht zugeordnet werden.

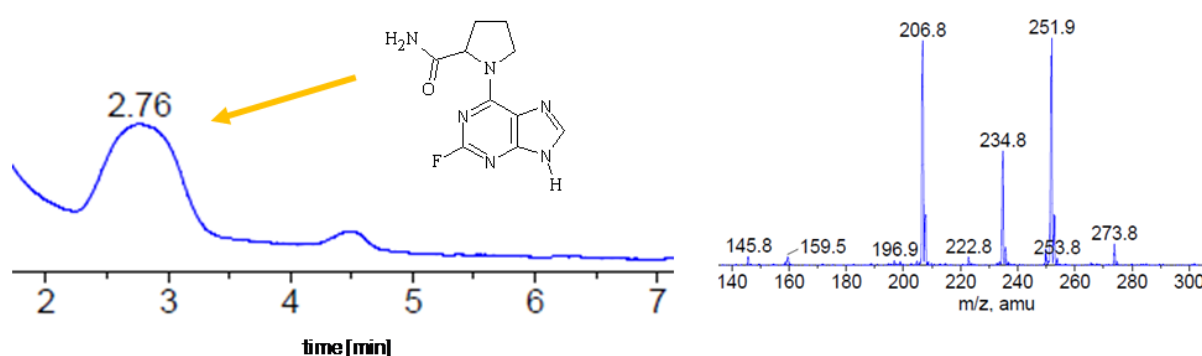


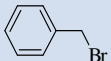
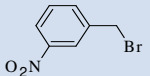
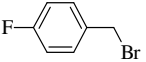
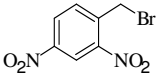
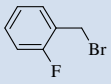
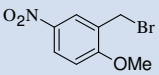
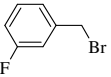
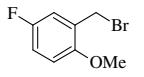
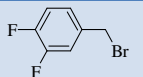
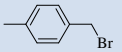
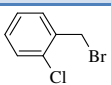
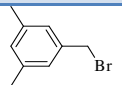
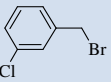
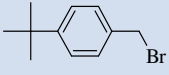
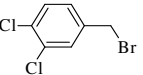
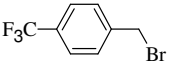
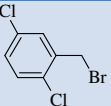
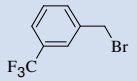
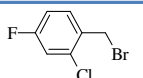
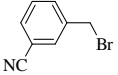
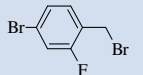
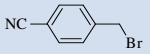
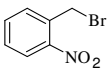
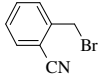
Abbildung 60: LC/MS-Analytik von 2-Fluoro-6-prolinylpurin nach 4 min Reaktionszeit;
links: UV-Spur; rechts: Massendetektion bei 2,8 min

3.3.5 Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüstes auf SP.2

Für die Reaktion werden die optimierten Bedingungen der Einzelsynthese verwendet (*Kapitel 3.1.4 & 5.6.5*). Jeder Träger SP.2 wird dabei separat behandelt. Für alle 6 Membranen wird die gleiche örtliche Verteilung der Reagenzien verwendet. Die Spots einer Spalte werden jeweils mit dem gleichen Bromid umgesetzt, so dass insgesamt 24 verschiedene Benzylbromide benutzt werden. Die Substanzen werden so gewählt, dass sie bezüglich der letzten, anschließenden Synthesestufe (Fluorsubstitution an C-2) keine reaktiven Gruppen aufweisen. Die eingesetzten Bromide mit der zugehörigen Spalten-Nummer werden in *Tabelle 10* wiedergegeben.

3. Substanzbibliothek

Tabelle 10: Verwendete Benzylbromide in der SPOT-Synthese unter Angabe der Spalten-Nummer

Nr.	Substanz	Struktur	Nr.	Substanz	Struktur
1	Benzylbromid		13	3-Nitrobenzylbromid	
2	4-Fluoro-benzylbromid		14	2,4-Dinitrobenzylbromid	
3	2-Fluoro-benzylbromid		15	2-Methoxy-5-nitrobenzylbromid	
4	3-Fluoro-benzylbromid		16	5-Fluor-2-methoxybenzylbromid	
5	3,4-Difluoro-benzylbromid		17	4-Methylbenzylbromid	
6	2-Chloro-benzylbromid		18	3,5-Dimethylbenzylbromid	
7	3-Chloro-benzylbromid		19	4-tert.-Butylbenzylbromid	
8	3,4-Dichloro-benzylbromid		20	4-Trifluormethylbenzylbromid	
9	2,5-Dichloro-benzylbromid		21	3-Trifluormethylbenzylbromid	
10	2-Chloro-4-fluoro-benzylbromid		22	3-Bromomethylbenzonitril	
11	4-Bromo-2-fluoro-benzylbromid		23	4-Bromomethylbenzonitril	
12	2-Nitrobenzylbromid		24	2-Bromomethylbenzonitril	

Die Dauer des Spot-Vorganges beträgt etwa 30 min pro Membran. Im Gegensatz zur Einzelsynthese können sich in dieser Zeit bereits Teile der Reaktionslösung vor dem Erhitzen in der Mikrowelle verflüchtigen. Während der 5 maligen Durchführung ergibt sich für die Spots in Spalte 12 eine stark zunehmende Braunfärbung (*Abbildung 61*). Diese Spalte entspricht dem 2-Nitrobenzylbromid. Vermutlich auf Grund der stark elektronenziehenden Nitrogruppe ergibt sich hier eine besonders hohe Reaktivität, die durch die entstehende Reaktionswärme zu einer Verbrennung der Cellulose führt.

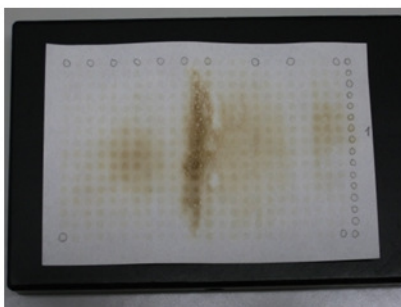


Abbildung 61: Eine der Membranen SP.3; Spalte 12 zeigt die Beladung mit 2-Nitrobenzylbromid

Bei den übrigen Membranen wird daher auf diese Substanz verzichtet und stattdessen reines Lösemittel (NMP) aufgetragen. Analog zur Einzelsynthese weisen die Spots der erhaltenen Träger *SP.3* eine schwache Braunfärbung auf.

Kontrollsubstanzen:

In Spalte 25 wird auf jeder Membran in den Zeilen 9-12 das 3-Chlorbenzylbromid gespottet. Für die Zeilen 13-16 wird Benzylbromid verwendet. Auf jedem Blatt werden daher je 4 Kontrollen erhalten, die mit den beiden bereits in der Einzelsynthese positiv getesteten Bromiden umgesetzt worden sind. Je ein Kontroll-Spot der Membranen 1-4 wird davon für eine vorgezogene Charakterisierung verwendet (s. unten). Die übrigen 8 Kontrollen (Zeilen 1-8) auf jedem Blatt sind jeweils auf den Membranen 1+2, 3+4 und 5+6 gleich. Dabei werden die 24 Benzylbromide fortlaufend verteilt. Die Reihenfolge entspricht dabei der Reihenfolge für die Spalten 1-24. So wird jedes Bromid zweimal gespottet und mit verschiedenen Diversitäten kombiniert.

Charakterisierung:

Wie in *Kapitel 5.3.10 & 5.3.11* beschrieben, werden die zu testenden Kontrollspots von der Membran ausgestanzt, und die Substanzen vom Träger abgespalten. Als Kontrollen werden je Blatt die Spots I25 bzw. N25 verwendet, wobei Zeile I dem 3-Chlorobenzylbromid, bzw. Zeile N dem Benzylbromid in Cyclus 3 entspricht. Die Charakterisierung erfolgt per LC/MS (APCI). Nur in zwei von zwölf Fällen kann Produktbildung nachgewiesen werden. *Abbildung 62* zeigt das Chromatogramm für eine der analysierten Kontrollen. Der Reaktionsumsatz ist sehr gering. Alle Kontrollsubstanzen weisen einen vergleichsweise hohen Anteil an der Nebenreaktion mit Bromomethylbenzonitril auf. Drei verschiedene Isomere dieses Bromids werden jeweils in den drei benachbarten Spalten (Spalte 22-24) eingesetzt (vgl. *Tabelle 10*). Diese Nebenreaktion belegt eine ungewünschte örtliche Verteilung und Durchmischung von Reaktanden über die Gasphase. Vermutlich verdampft die entsprechende Reaktionslösung während der Reaktionsführung in der Mikrowelle und verteilt sich während der Kondensation an der Glasabdeckung. Eine Zuordnung, welches der isomeren Benzonitrile hier zu der Nebenreaktion führt, ist per MS zwar nicht möglich, allerdings ist auf Grund der örtlichen Nähe zur Kontrollspalte die Reaktion mit 2-Bromomethylbenzonitril (Spalte 24) wahrscheinlich.

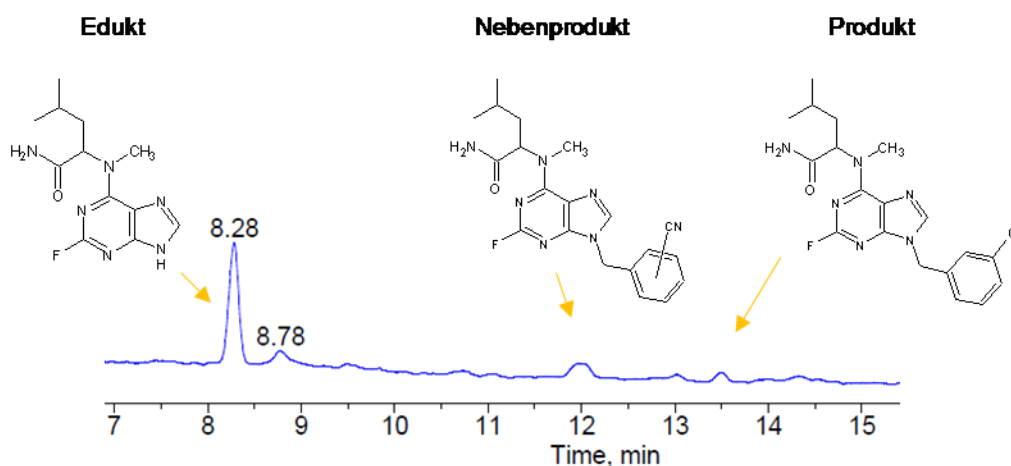


Abbildung 62: Charakterisierung eines Kontrollspots (Blatt 2, Zeile 11) nach Cyclus 3 per LC/MS (UV-Spur)

Für die Kopplung von Aminosäuren und des Puringrundgerüsts an Cellulosemembranen stellt die SPOT-Synthese eine schnelle und effektive Synthesemethode dar. Die Einführung des 2. Diversitätspunktes kann jedoch nicht zufriedenstellend erfolgen. Ein vorzeitiges Verdampfen der Komponenten während des Spot-Prozesses vermindert die tatsächlich eingesetzten Stoffmengen. Die erzielte Produktbildung wird dadurch verhindert. Weiterhin wird eine örtlich definierte Reaktion durch eine Verteilung der Reaktanden in der Gasphase unmöglich. Die Synthese wird daher an dieser Stelle abgebrochen. Die SPOT-Methode ist folglich nicht geeignet, um eine Bibliothekssynthese nach den erarbeiteten Reaktionsbedingungen vollständig durchzuführen.

3.4 Bibliothekssynthese nach der Cut & Combine Methode

Anhand einer Einzelsynthese sind Reaktionsbedingungen für die Darstellung 2,6,9-trisubstituierter Purine untersucht und optimiert worden (*Kap. 3.2.*). Eine Übertragung auf den Ansatz der SPOT-Methodik konnte jedoch nicht vollständig durchgeführt werden (*Kap. 3.3.*). Ein weiterer kombinatorischer Ansatz ist die 1998 entwickelte Cut & Combine Technik (54). Die Synthese der Purinbibliothek soll nun mit Hilfe dieser Methode erfolgen. Für jeden Reaktionsschritt mit einem bestimmten Reagenz erfolgt hierbei eine separate Durchführung. Eine Kontamination mit örtlich falsch adressierten Reagenzien ist somit ausgeschlossen.

Jedem Celluloseträger wird anhand der daran gekoppelten Verbindung in der Cut & Combine-Synthese (**CnC**) eine Bezeichnung zugeordnet (*Abbildung 63*):

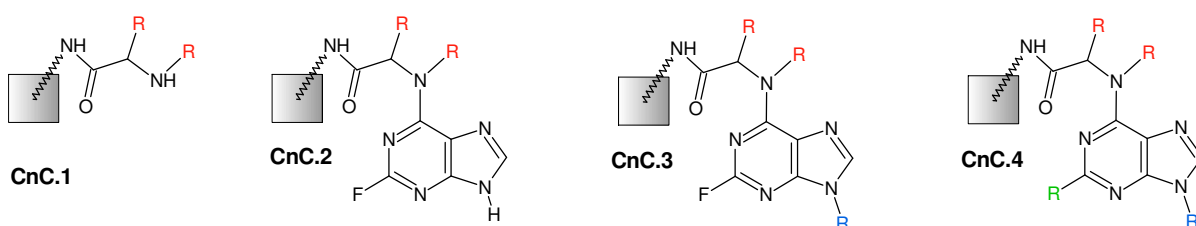


Abbildung 63: Bezeichnung der Celluloseträger in der Cut & Combine Synthese

Auf einer Cellulosemembran von 11,25 cm x 7,2 cm Fläche wird ein Raster eingezeichnet (*Abbildung 64*). Auf jedem der erzeugten 25 x 16 Positionsquadrate von 0,45 cm Kantenlänge wird ein anderes trisubstituiertes Purin synthetisiert. Die Fläche von 0,20 cm² entspricht der doppelten Fläche eines Spots in der Spotsynthese (*Kap. 3.3.1*). Die Quadrate werden mit einem Bleistift codiert. Die Zeilenposition wird dabei durch einen Buchstaben (A-P), die Spaltennummer durch

eine Zahl (1-24) wiedergegeben. Eine 25. Spalte entspricht den Kontrollsubstanzen und wird gesondert behandelt.

Abbildung 64: Celluloseträger: Bibliotheksteil (A1-P24) und Kontrollspalte (A25-P25)

Der Bibliotheksteil (A1-P24) wird in 4 gleiche Teile geschnitten. Auf jedem Teil wird eine sekundäre Aminosäure als 1. Diversitätspunkt (R_1) der Bibliothek immobilisiert. Die Viertel werden entsprechend der Spalten in je 12 Streifen geschnitten. Jeweils alle ersten, zweiten, dritten (usw.) Streifen eines Viertels werden mit dem gleichen Benzylbromid umgesetzt. Auf diese Weise wird der 2. Diversitätspunkt durch 12 verschiedene Reste R_2 repräsentiert. Durch reihenweises Separieren in die 16 Zeilen werden danach die einzelnen Quadrate erhalten. Entsprechend wird dann auf der jeweils ersten, zweiten, dritten (usw.) Zeile dasselbe Amin aufgetragen und gebunden. Der 3. Diversitätspunkt wird so durch 8 verschiedene Amine dargestellt. Die gesamte Substanzmenge der Bibliothek ergibt sich folglich zu $4 \times 12 \times 8 = 384$ verschiedenen Purinderivaten.

Die Cut & Combine Technik wird im Gegensatz zur SPOT-Methode nicht automatisiert durchgeführt. Auf Grund des daher höheren zeitlichen Aufwandes wird die Bibliothekssynthese nur an Hand einer Membran durchgeführt. Dies resultiert in einer verminderten aber immer noch recht hohen Anzahl an generierten Substanzen.

3.4.1 Versuche zur Auflösung von APEG-Aminocellulose

Hinsichtlich der späteren Überführung der Substanzsammlung in ein bekanntes Mikroarray-Format soll die Cellulose mit der daran gebundenen Substanz unter Säureeinsatz aufgelöst werden (Kap. 1.3.2). Für die versuchte SPOT-Synthese ist im Gegensatz zur Einzelsynthese daher eine lösliche Cellulosemembran verwendet

worden. Vermutlich ist die Zerstörung des Trägers während der Mikrowellenbehandlung (*Kap. 3.3.4*) auf diese weniger stabile Form der Membran zurückzuführen. Daher soll hier die für die Einzelsynthese eingesetzte APEG-Aminocellulose benutzt werden. Da diese jedoch vom Hersteller als säurestabilisiert angegeben wird, müssen zuerst entsprechende Auflösungsversuche erfolgen.

Der Auflösungsprozess (SC²-Prozess) ist für substanzgebundene Cellulosespots beschrieben worden (40) und muss hier zunächst angepasst werden. Die zu testende APEG-Aminocellulose wird in vergleichbarer Größe zu einem Spot eingesetzt (0,125 cm²). Vier solcher Schnipsel werden in Auflösungsreagenzien verschiedener Zusammensetzung (I-IV) behandelt. *Tabelle 11* gibt die jeweiligen Komponenten und Anteile wieder. Dabei entspricht Reagenz III der in der Literatur verwendeten Lösung (40).

Tabelle 11: Zusammensetzung der an APEG-Aminocellulose getesteten Auflösungsreagenzien (I-IV) in % (v/v)

	Reagenz I	Reagenz II	Reagenz III	Reagenz IV
TFA	80	88,5	82	90
DCM	14	-	10	7
TIBS	6	2,5	3	3
TFMSA	-	4	-	-
H₂O	-	5	5	-

TFA stellt als starke Säure die wichtigste Komponente dar. Die polymeren Celluloseketten werden dadurch hydrolytisch verkürzt, um schließlich eine lösliche Form zu erlangen. Triisobutylsilan (TIBS) und Wasser dienen als Radikalfänger, die insbesondere bei einer gleichzeitigen Entschüttung im Fall von Peptiden notwendig wären. Dichlormethan (DCM) wird als Lösungsvermittler für das Silan verwendet. Um eine besonders hohe Säurestärke für die Auflösung der säurestabilisierten Membran zu erhalten, wird einem Reagenz (II) die Supersäure Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) hinzugefügt.

Nachdem die Membranschnipsel über Nacht in je 300 µl der Reagenzien geschüttelt worden sind, ist jeder Träger nur teilweise zerfallen und es hat sich eine Suspension gebildet. Die Behandlung im Ultraschallbad führt im Fall II zu einer einheitlich klaren Lösung. Die übrigen Proben werden 3 weitere Tage geschüttelt. In Reagenz I und IV ergibt sich eine Suspension feiner Partikel, Probe III verbleibt als trübes Gemisch. Demnach kann nur in dem TFMSA haltigem Reagenz (II) eine vollständige Auflösung der festen Phase erzielt werden. Nach dem weiteren Verfahren des SC²-Prozesses (allgemeine Vorschrift s. *Kap. 5.3.12*) wird die gewünschte Lösung in DMSO erhalten.

Der literaturbekannte SC²-Auflösungsprozess für Cellulose wird modifiziert. Durch die zusätzliche Komponente TFMSA kann hier eine Auflösung auch von säurestabilisierter Cellulose (APEG-Aminocellulose) erreicht werden. Es kann gezeigt werden, dass sich diese Membran ebenfalls eignet, um eine Bibliothek zu generieren und anschließend in ein Mikroarray-Format zu überführen.

3.4.2 Einfluss des Auflösungsreagenzes auf ein trisubstituiertes Purin

Auf Grund der hohen Säurestärke der TFMSA sollte ein möglicher Einfluss auf die zu erzeugenden Substanzen untersucht werden. Dazu wird die Modellsubstanz (9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin) einzelsynthetisch hergestellt (*Kap. 5.5.1*) und vom entsprechenden Träger *ES.4* abgespalten. Von der erhaltenen Lösung in DMSO (50 µl) werden 30 µl abgenommen und zu 300 µl des TFMSA haltigen Auflösungsreagenzes gegeben. Nachdem die Lösung 24 h geschüttelt worden ist, erfolgt die Analytik per LC/MS. Eine weitere Injektion wird nach 7 d zusätzlichen Schüttelns als Vergleich durchgeführt.

Charakterisierung:

Die Substanz wird vermessen und mit dem Ergebnis der unbehandelten Substanz (*Abbildung 48, Kap. 3.1.5*) verglichen. Nach der Behandlung bleibt der Produktpeak in der Probe erhalten (*Abbildung 65*; $R_t = 9,1$ min; leicht geringere Retentionszeit auf Grund der Messung an einem anderen Gerät mit ESI-Quelle; vgl. *Kap. 3.1.5*). Verglichen mit dem reinen Auflösungsreagenz (Chromatogramm nicht gezeigt) ergibt sich jedoch ein zusätzlicher Peak in der UV-Spur bei $R_t = 12,9$ min. Eine Ionisation der zugehörigen Substanz erfolgt weder per APCI-, noch per ESI-MS. Dementsprechend kann keine Masse detektiert werden, und eine weitere Charakterisierung kann auf diesem Wege nicht durchgeführt werden. Auf Grund der Struktur ist eine Protonierung insbesondere des tertiären Stickstoffatoms an C-6 möglich. Bei einer üblichen Produktabspaltung vom Träger per TFA in der Gasphase tritt das hier beobachtete Nebenprodukt allerdings nicht auf. Eine Rückführung auf eine einfache Protonierung des Produktes oder daran anschließende Folgereaktionen ist daher unwahrscheinlich. Auch eine Umsetzung des Produktes mit TIBS ist nicht zu vermuten. Im Gegensatz zur Zielsubstanz wird keine Ionisation beobachtet, obwohl diese für protonierbare Substanzen mit funktionellen Gruppen besonders per APCI zu erwarten wäre. Auf Grund dieser Tatsachen ist anzunehmen, dass es sich bei dem Nebenprodukt nicht um ein entstandenes Derivat handelt. Dagegen spricht auch die vergleichsweise hohe Retentionszeit. Die Bildung bleibt ungeklärt. Eine Veränderung der Peaks wird nach einer weiterführenden siebentägigen Behandlung im Chromatogramm nicht beobachtet.

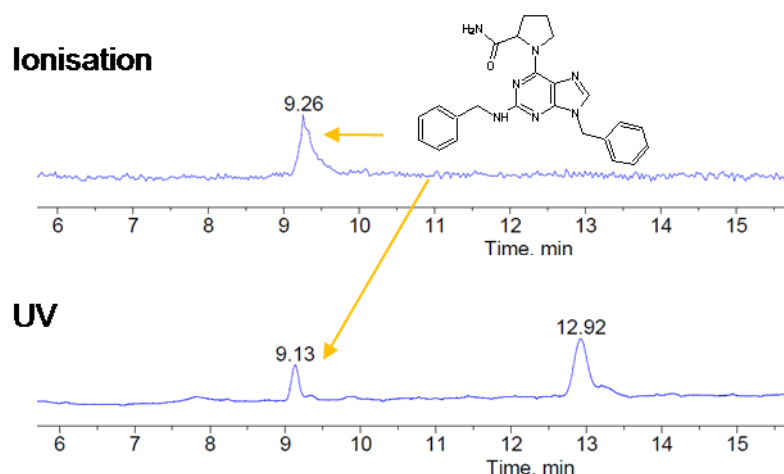


Abbildung 65: LC/MS-Charakterisierung von 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin nach Behandlung mit TFMSA haltigem Auflösungsreagenz

Die Behandlung eines trisubstituierten Purins in DMSO mit dem TFMSA haltigen Auflösungsreagenz ergibt einen Zusatzpeak bei der chromatographischen Charakterisierung. Diese Substanz unterliegt jedoch keiner Ionisation und kann hier daher massenspektrometrisch nicht zugeordnet werden. Eine theoretische Erklärung kann aus der molekularen Struktur nicht abgeleitet werden. Trotz des ungeklärten Auftretens dieses weiteren Peaks bei der LC/MS Analytik bleibt der Produktpeak auch nach mehrtägiger Behandlung in dem Auflösungsreagenz unverändert erhalten. Das Reagenz wird daher für die Auflösung der Bibliothek nach der Synthese eingesetzt.

3.4.3 Cyclus 0: Kopplung von Spacer und Linker

Die Reaktionsbedingungen werden analog zu den in der Einzelsynthese ermittelten Bedingungen eingehalten. Die eingesetzten Volumina werden entsprechend der Membranfläche angepasst. Die jeweilige Reaktionsführung folgt der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3*).

Kontrollspalte 25 wird von der Membran abgetrennt und separat behandelt. Daran wird Fmoc-Rink Linker analog der Einzelsynthesebedingungen (*Kap. 5.5.1.1*) gekoppelt. Die hier als Kontrollen generierten Verbindungen können nach der Synthese am Linker abgespalten und analysiert werden. Auf die gesamte übrige Fläche (Bibliotheksteil) wird als Spacermolekül Fmoc geschütztes β -Alanin gebunden. Die genaue Durchführung wird in *Kapitel 5.7.3* beschrieben. Die Bromphenolblau haltigen Reaktionslösungen färben die Träger zunächst blau an. Über Nacht entfärbt sich der Bibliotheksteil komplett, der Kontrollstreifen wird noch schwach blau erhalten. Die Substanzen werden nach einem Capping entschützt und

die Beladungswerte bestimmt (Kap. 5.3.8 & 5.3.9). Diese liegen mit $0,87 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ für β -Ala, bzw. $0,92 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ für Rink Linker über der vom Hersteller angegebenen Mindestbeladung mit Aminogruppen von $0,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$. Die Umsetzung kann also als nahezu quantitativ angesehen werden. Pro Quadrat ($0,20 \text{ cm}^2$) ergibt sich damit eine Beladung von etwa $0,18 \mu\text{mol}$. Die feste Phase wird als farbloser Träger erhalten.

3.4.4 Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren an die Celluloseträger

Sowohl der Bibliotheksteil, als auch der Kontrollstreifen werden geviertelt, so dass die in *Abbildung 66* dargestellten Teile entstehen. Auf jeden Abschnitt wird eine andere Aminosäure in Fmoc geschützter Form gebunden, so dass die Träger *CnC.1* entstehen. Verwendet werden vier der in der Einzelsynthese als positiv getesteten Substanzen (Kap. 3.2.3.1), um den 1. Diversitätspunkt (R_1) der Bibliothek darzustellen.

Pro	Cmpi	Pro
		Cmpi
MeLeu	Tic	MeLeu
		Tic

Abbildung 66: Vierteilung von Bibliotheksteil und Kontrollstreifen mit jeweiliger örtlicher Verteilung der Aminosäuren

Die vier Abschnitte entsprechen den Quadranten von A1-H12 (Pro), A13-H24 (Cmpi), I1-P12 (MeLeu) und I13-P24 (Tic) (vgl. *Abbildung 64*, Kap. 3.4). Für die Kontrollen gilt die Einteilung von A-D (Pro), E-H (Cmpi), I-L (MeLeu) und von M-P (Tic). Für die Reaktion werden je die Träger für die gleiche Aminosäure in eine PE-Folie eingeschweißt und unter Blaufärbung mit der BPB haltigen Reaktionslösung versehen. Wie zu erwarten nimmt die Blaufärbung, entsprechend einer Abnahme an freien Aminogruppen am Träger, während der Reaktion über Nacht ab. Die intensivste Restfärbung bleibt für den Cmpi beladenen Teil vorhanden. Grund ist die hohe Basizität dieser Aminosäure, welche aus der tertiären Aminogruppe innerhalb des Moleküls hervorgeht (vgl. *Tabelle 8*, Kap. 3.2.3.1). Nicht umgesetzte Aminogruppen werden entsprechend der allgemeinen Vorschrift gecappt und die Aminosäuren anschließend entschützt.

Charakterisierung:

Die bestimmten Beladungswerte durch die Fmoc Schutzgruppen ergibt sich zwischen $0,73 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ für Tic und $0,80 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ für Prolin. Bezogen auf die maximale Stoffmenge von $0,87 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ mit β -Ala ergeben sich somit Ausbeuten der Aminosäurekopplung von 84 % (Tic) bis 92 % (Pro). Pro Quadrat sind folglich mindestens $0,15 \mu\text{mol}$ entschützter Aminosäuren vorhanden. Die Träger *CnC.1* werden abschließend als farblose Membranen enthalten.

3.4.5 Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüsts an CnC.1

Die Kopplung des Puringrundgerüsts an die Aminosäuren (vgl. *Abbildung 43, Kap. 3.1.3*) findet nach den optimierten Einzelsynthesebedingungen statt. Die genaue Durchführung wird in *Kapitel 5.7.5* beschrieben. Während der SPOT-Synthese hat diese Übertragung auf den großen Maßstab zu einer Zerstörung der Membran geführt (*Kap. 5.6.4*). Für eine geringere Entwicklung von Reaktionswärme werden hier daher die einzelnen Viertel (inkl. der jeweiligen Kontrollmembran) separat in der Mikrowelle behandelt, obwohl jede Aminosäure gleichermaßen mit dem 2-Fluoro-6-chloropurin zu *CnC.2* umgesetzt werden soll. Die Membranviertel werden liegend auf einer Weflonplatte mit einem Volumen an Reaktionslösung versehen, welches der Träger gerade aufnehmen kann. In der Einzelsynthese ist die Reaktion bei 160°C für 15 min in der Mikrowelle durchgeführt worden. Die Ergebnisse aus der SPOT-Synthese haben jedoch gezeigt, dass die Reaktion auch bei einer Verkürzung auf 4 min zu der erwünschten Umsetzung führt (*Kap. 5.6.4*). In der Cut & Combine Synthese wird die Kopplungsreaktion für 5,5 min durchgeführt. Auf diese Weise soll eine möglichst quantitative Substitution durch alle Aminosäuren gewährleistet sein. Im Gegensatz zu den Trägern in der SPOT-Synthese (*Kap. 5.6.4*) wird hier keine Braunfärbung oder Zerstörung der Membranen während der Behandlung beobachtet. Diese Verbesserung resultiert vermutlich hauptsächlich aus der Verwendung des anderen Celluloseproduktes (APEG; vgl. *Kap. 3.4.1*). Nicht umgesetzte Aminogruppen werden gecappt, und die als leicht gelblich erhaltenen Träger *CnC.2* aufgearbeitet.

Eine Charakterisierung findet an dieser Stelle nicht statt.

3.4.6 Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüsts auf CnC.2

Die nucleophile Substitution der N-9-Position des Puringrundgerüsts mit verschiedenen Benzylbromiden erfolgt nach den optimierten Bedingungen der Einzelsynthese, *Kapitel 3.1.4*. Die Reaktionsgleichung wird dort in *Abbildung 45* für die Modellreaktion gezeigt. Die genaue Durchführung beschreibt *Kapitel 5.7.6*. Für

3. Substanzbibliothek

die Erstellung des 2. Diversitätspunktes werden die 4 Membranviertel der Einteilung aus Cyclus 1 je auf die gleiche Weise mit 12 verschiedenen Benzylbromiden umgesetzt. Verglichen mit der SPOT-Synthese wird hier eine geringere Anzahl an Substanzen verwendet, da die Bibliothek insgesamt kleiner ausfällt. Unter anderem wird auf 2-Nitrobenzylbromid verzichtet, welches zu einer Verbrennung der Cellulose geführt hat (Kap. 3.3.5).

Die Membranviertel *CnC.2* werden jeweils in ihre 12 Spalten separiert. Jede Spalte besteht aus 8 Positionsquadraten. Zuerst werden alle Spalten, die mit dem ersten Bromid umgesetzt werden sollen, auf einer Weflonplatte abgelegt. Dies ist jeweils die erste Spalte jedes Viertels (A1-H1, A13-H13, I1-P1, I13-P13). In *Abbildung 67* werden die betreffenden Spalten markiert dargestellt. Mit dem Bromid 1 wird auch das erste Quadrat des Kontrollstreifens (A25) umgesetzt und dieses daher ebenfalls auf der Weflonplatte abgelegt.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16
2	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16
3	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16
4	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
5	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16
6	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
7	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16
8	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16
9	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16
10	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16
11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16
12	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16
13	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16
14	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16
15	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16
16	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16

Abbildung 67: Schema der Membranteilung für die Umsetzung mit dem Benzylbromid 1; die jeweils erste Spalte eines Viertels und die zugehörige Kontrolle sind in blau gekennzeichnet; die in rot dargestellte Teilung entspricht den vier verschiedenen Aminosäuren aus Cyclus 1

Die vier Streifen und das Kontrollquadrat werden mit möglichst geringem Abstand zueinander auf der Weflonplatte positioniert. Auf diese Weise wird bei der Abdeckung durch die Glasscheibe ein Flüssigkeitsfilm über alle Membranteile gebildet. Ein eventuelles Verdampfen von Lösung soll so durch Diffusion entlang des Films und aller Träger ausgeglichen werden. Das Volumen der Reaktionslösung wird so gewählt, dass die Träger die Flüssigkeit gerade aufnehmen können. Wie in der Einzelsynthese werden die Bromide in 2,2 M Lösung eingesetzt. Eine Ausnahme bildet 2-Methoxy-5-nitrobenzylbromid, das auf Grund geringerer Löslichkeit nur in 1,1 M Lösung verwendet werden kann. Die Reaktion erfolgt bei 160 °C in der Mikrowelle für 15 min und wird analog zur Einzelsynthese 4 mal wiederholt.

Nachdem die Reaktion mit dem Benzylbromid 1 durchgeführt worden ist, erfolgt das gleiche Prozedere nacheinander mit den übrigen 11 Bromiden und den

dazugehörigen Spalten. Die 12 verwendeten Substanzen mit den zugehörigen Beladungspositionen (Spalten) werden in *Tabelle 12* dargestellt. Für das n -te Benzylbromid wird je Membranviertel der n -te Streifen und das n -te Kontrollquadrat (1. Quadrat = A, 2. Quadrat = B, usw.) verwendet. Der erste Streifen jedes Membranviertels wird also durch die Spalten 1+13 abgedeckt (vgl. *Abbildung 67*). Die übrigen 4 Kontrollquadrate (M-P) werden zusammen mit den Spalten 1,6,8 bzw. 11 behandelt. Insgesamt wird so für die Kopplung des 2. Diversitätspunktes der Prozess 12 mal durchgeführt. In der Tabelle ist weiterhin der Siedepunkt (Sdp.) bzw. der Schmelzpunkt (Smp.) der Substanzen aufgeführt. Der Siedepunkt soll für die Reaktionsführung in der Mikrowelle möglichst weit über der Zieltemperatur liegen, da die Reaktionszeit durch Verdampfen des Lösemittels begrenzt würde. Den geringsten Siedepunkt besitzt Benzylbromid. Dieser liegt mit 198 °C noch 38 °C über der Zieltemperatur in der Mikrowelle.

Am Ende liegt jede Aminosäure kombiniert mit jedem Benzylrest vor; und zwar an 8 Quadraten pro Streifen, entsprechend der 8 Zeilen eines Streifens.

Alle Träger CnC.3 werden als leicht mittelbraune Streifen, bzw. Kontrollquadrate erhalten. Ausnahmen bilden die mit 2-Methoxy-5-nitrobenzylbromid umgesetzten Spalten (7+19) und die entsprechende Kontrolle G. Eine hier erhaltene intensive Gelbfärbung ergibt sich durch die Vergrößerung des aromatischen Resonanzsystems durch die Nitrogruppe. *Abbildung 68* zeigt eine zufällige Auswahl erhaltener Streifen (die obersten Quadrate (I) sind hier bereits für die nächste Reaktionsstufe abgetrennt worden).


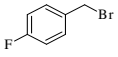

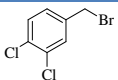
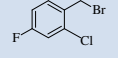
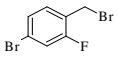
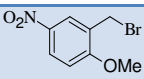
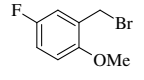
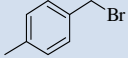
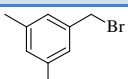


Eine Charakterisierung wird an dieser Stelle nicht durchgeführt.



Abbildung 68: Zufällige Auswahl an Trägern CnC.2.
Das Quadrat aus Zeile I ist bereits jeweils für die nächste Reaktionsstufe abgetrennt worden

3. Substanzbibliothek

Tabelle 12: Eingesetzte Benzylbromide und die zugehörigen Beladungspositionen auf CnC.2

Nr.	Benzylbromid	Struktur	Spalten	Kontrolle	Sdp. (Smp.) [°C]
1	Benzylbromid		1+13	A, M	198
2	4-Fluorobenzylbromid		2+14	B	203
3	3-Chlorobenzylbromid		3+15	C	238
4	3,4-Dichlorobenzylbromid		4+16	D	305
5	2-Chloro-4-fluorobenzylbromid		5+17	E	(37)
6	4-Bromo-2-fluorobenzylbromid		6+18	F, N	265 (30)
7	2-Methoxy-5-nitrobenzylbromid		7+19	G	(77)
8	5-Fluor-2-methoxybenzylbromid		8+20	H, O	(62)
9	4-Methylbenzylbromid		9+21	I	(36)
10	3,5-Dimethylbenzylbromid		10+22	J	235 (40)
11	3-Trifluormethylbenzylbromid		11+23	K, P	211
12	2-Bromomethylbenzonitril		12+24	L	(74)

3.4.7 Cyclus 4: Derivatisierung an C-2 des Puringrundgerüsts auf CnC.3

Die nucleophile aromatische Fluorsubstitution durch Amine zeigt *Abbildung 47* (Kap. 3.1.5) an Hand der Modellreaktion. Die Reaktionsbedingungen entsprechen der dort beschriebenen Einzelsynthese und werden für die Cut & Combine Methode in *Kapitel 5.7.7* dargestellt. Für die Erstellung des 3. Diversitätspunktes werden prinzipiell alle Membranstreifen *CnC.3* auf die gleiche Weise mit 8 verschiedenen Aminen umgesetzt. Die Auswahl der Amine erfolgt entsprechend einer möglichst hohen gewünschten Variabilität der Substanzen. Für die Umsetzung werden die Träger *CnC.3* jeweils entlang der Reihen separiert. Dabei entstehen aus den Streifen aus Cyclus 3 die einzelnen Positionsquadrate jeder Zeile.

Zuerst werden alle Quadrate, die mit dem ersten Amin umgesetzt werden sollen, auf einer Weflonplatte positioniert. Dies ist jeweils die erste Zeile jedes Membranviertels

aus Cyclus 1, inkl. der zugehörigen Kontrollquadrate (A1-12, A13-25, I1-12, I13-25). In *Abbildung 69, a* werden die entsprechenden Reihen hervorgehoben dargestellt.

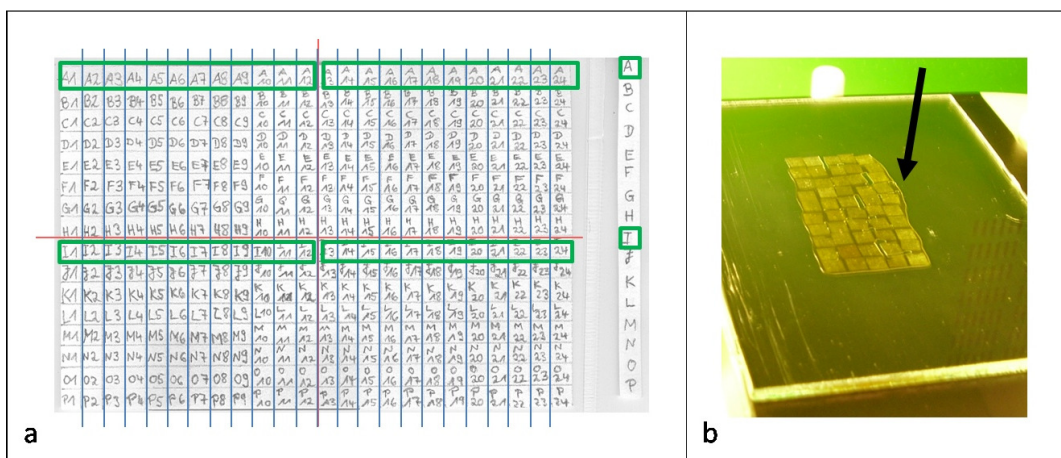


Abbildung 69: a: Schema der Membranteilung für die Umsetzung mit dem Amin 1; die jeweils erste Zeile eines ursprünglichen Membranviertels und die zugehörige Kontrolle der Zeile sind in grün gekennzeichnet
b: enge Positionierung von 50 Quadraten auf der Weflonplatte; Ausbildung eines Flüssigkeitsfilms (Pfeil) bei der Abdeckung mit einer Glasplatte.

Die Schnipsel werden mit geringem Abstand zueinander auf der Platte abgelegt. So umschließt der entstehende Flüssigkeitsfilm bei der Abdeckung durch die Glasscheibe alle Träger (*Abbildung 69, b*). Entlang des Films soll auf diese Weise ein eventuelles Verdampfen von Flüssigkeit durch Diffusion entlang der Träger ausgeglichen werden. Es wird ein Volumen an Reaktionslösung verwendet, welches die Träger gerade aufnehmen können. Die Reaktion wird bei 170 °C für 30 min in der Mikrowelle durchgeführt und analog zur Einzelsynthese 4 mal wiederholt.

Nach der Durchführung der Reaktion mit Amin 1 erfolgt der gleiche Vorgang nacheinander für die übrigen 7 Amine und den dazugehörigen Membranzeilen. Die 8 Substanzen mit den entsprechenden Beladungspositionen werden in *Tabelle 13* wiedergegeben. Für das n -te Amin wird je die n -te Zeile jedes ursprünglichen Membranviertels beladen. Dies bedeutet Amin 2 wird mit Zeile B und mit Zeile J umgesetzt, usw. Pro Amin und Durchgang werden demnach 50 Membranquadrate CnC.3 beladen. Dieser Prozess wird entsprechend den 16 Zeilen 8 mal durchlaufen. Für die Reaktionsführung in der Mikrowelle soll die Siedetemperatur der Substanzen möglichst weit über der Zieltemperatur liegen, um ein Verdampfen der Flüssigkeiten zu vermeiden. In *Tabelle 13* sind die entsprechenden Siede- bzw. die Schmelztemperaturen der Amine wiedergegeben. Mit 197 °C liegt selbst der niedrigste Siedepunkt (4-Trifluoromethylbenzylamin) noch 27 °C über der Reaktionstemperatur. Für Amin Nr. 6 ist der Siedepunkt nicht bekannt. Es handelt sich jedoch um eine hochviskose Substanz. Das Isomer 1-(4-Methoxyphenyl)-piperazin schmilzt erst bei 34 °C.

Abschließend liegt jedes an *CnC.4* erhaltene Purin mit jeder möglichen Kombination der 3 Diversitätspunkte jeweils auf einem Positionsquadrat der Fläche 0,20 cm² vor. Die zuvor mittelbraunen Träger (*CnC.3*) werden jetzt als farblose Träger *CnC.4* erhalten. Ausnahmen bilden die Quadrate mit Nitrogruppen haltigem 2. Diversitätspunkt (vgl. *Kap. 3.4.6*), die als intensiv gelb erhalten werden. Einige der Träger werden im Laufe der Reaktionscyclen leicht brüchig. Eine Aufarbeitung erfolgt daher besonders schonend bei nur langsamem Schütteln. *Abbildung 70* zeigt die erhaltenen Träger der Zeilen J und B nach der Aufarbeitung.

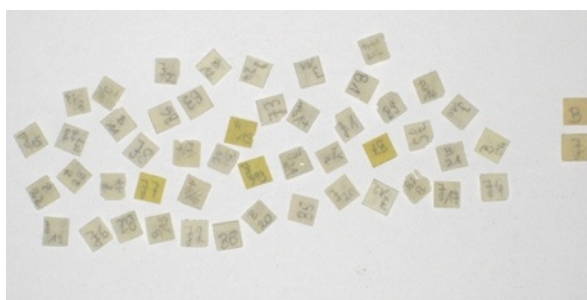


Abbildung 70: Membranschnipsel CnC.4 der Zeilen B+J nach der Aufarbeitung.
Am rechten Rand befinden sich die entsprechenden Kontrollen

Tabelle 13: Eingesetzte Amine und die zugehörigen Beladungspositionen auf CnC.3

Nr.	Amin	Struktur	Zeilen	Sdp. (Smp.) [°C]
1	4-Chlorobenzylamin	<chem>NCCc1ccc(Cl)cc1</chem>	A+I	215
2	2,3-Dimethoxybenzylamin	<chem>NCCc1cc(OC)c(OC)cc1</chem>	B+J	272
3	3-Chlorobenzylamin	<chem>NCCc1cccc(Cl)c1</chem>	C+K	232
4	Tyramin	<chem>NCCc1ccc(O)cc1</chem>	D+L	(160)
5	4-Benzylpiperidin	<chem>N1CCN(CCc2ccccc2)CC1</chem>	E+M	279
6	1-(2-Methoxyphenyl)-piperazin	<chem>CN1CCN(CCc2cc(OC)ccc2)CC1</chem>	F+N	unbekannt
7	1-Acetylpiperazin	<chem>CC(=O)N1CCNCC1</chem>	G+O	268 (31)
8	4-Trifluoromethylbenzylamin	<chem>NCCc1ccc(C(F)(F)F)cc1</chem>	H+P	197

Die kombinatorische Synthese nach der Cut & Combine Methode kann unter Erhalt von 384 Positionsquadraten abgeschlossen werden. Dementsprechend sind 384 verschiedene 2,6,9-trisubstituierte Purine an Cellulose als fester Phase synthetisiert worden. Dabei werden 16 verschiedene Derivate parallel als Kontrollen hergestellt. Die Charakterisierung der Kontrollen wird in *Kapitel 3.4.8* beschrieben.

3.4.8 Charakterisierung der Reaktionskontrollen

Die Charakterisierung der 16 auf Spalte 25 erzeugten Kontrollsubstanzen erfolgt nach Abspaltung vom Träger per LC/MS (*Kap. 5.3.10 & 5.3.11*). Diese Kontrollen sollen das generelle Funktionieren der kombinatorischen Synthese aufzeigen. An den Diversitätspunkten ist daher jeder in der Synthese verwendete Substituent in mindestens einer der Kontrollen enthalten. *Tabelle 14* gibt die jeweilige Struktur und das Positionsquadrat der Kontrollen wieder. Die LC/MS Daten werden im Anhang (1-16) gezeigt.

In allen Fällen wird das gesuchte Zielprodukt gefunden. Die erhaltenen Retentionszeiten und zugehörigen Massen der Molekül- und Tochterionen werden in *Kapitel 5.7.8* wiedergegeben. Dabei werden die zu erwartenden Isotopenverteilungsmuster Chlor- und Brom haltiger Verbindungen gefunden. Die Retentionszeiten der Produkte liegen zwischen 8,0 und 15,4 min. Einen großen Einfluss haben hier die hydrophoben Aminosäuren MeLeu und Tic, als auch unpolare Aromaten. Diese führen zu einer erwarteten erhöhten Retentionszeit auf Grund einer geringeren Polarität. Bei der Modellsubstanz häufig auftretende Fragmentationen (vgl. z.B. *Kap. 3.1.5*) entstehen nach Abspaltungen an der Aminosäure. Die auftretenden Tochterionen der Kontrollsubstanzen zeigen, dass diese Fragmentierungen in ihrer Intensität stark von der Struktur der Säure abhängen. Während mit MeLeu als Aminosäure immer sowohl die Abspaltung von Amino-, als auch von der Amidgruppe auftreten, ergibt sich letzteres für Prolin nur teilweise. Mit Tic wird höchstens das deaminierte Fragment gefunden, während mit Cmpi als Aminosäure in allen Fällen nur die Quasimolekülmasse erhalten wird.

Bei 11 der 16 Substanzen zeigt sich ein sehr hoher Umsatz (A-C, E, F, H, J, L-O). Davon kann bei den Cmpi haltigen Kontrollen E+F zusätzlich in sehr geringem Maße Nebenprodukt (an N-9 nicht derivatisiert) nachgewiesen werden. Zwei Substanzen (D+G) zeigen eine nur mäßige Reinheit: bei Kontrolle D ergibt sich eine nur etwa 50 %-ige Umsetzung an der C-2 Position des Purins; auch Kontrolle G zeigt neben dem Produktpeak einen etwa gleichgroßen weiteren Peak. Dieser entspricht u. a. der Masse des oben genannten Nebenproduktes. Weitere Massen dieses Peaks können nicht zugeordnet werden. Die übrigen drei (I, K, P) weisen nur sehr geringe

Substanzmengen auf, wobei das Produkt immer in mäßigen (I,P) bis hohen Anteilen (K) als Hauptpeak gefunden wird.

Das jeweils an N-9 unsubstituierte Nebenprodukt wird bei den Kontrollen E,F,G und M gefunden. Davon haben die ersten drei Substanzen die Aminosäure Cmpi gemeinsam. Dies deutet darauf hin, dass Cmpi die Nucleophilie des N-9 Stickstoffs am Puringrundgerüst gegenüber anderen Aminosäuren senkt. Ein solcher Einfluss ist jedoch von der Struktur her nicht zu erwarten.

Gelegentlich auftretende Peaks bei 8,8 min ($m/z = 214$ bzw. 236) stellen eine übliche Verunreinigung des Gerätes dar und können vernachlässigt werden (s. z. B. *Anhang 12*). Häufig werden hohe Anteile von überschüssigem Amin aus dem letzten Cyclus (Cyclus 4) detektiert. Die Amine werden folglich nach der Synthese nicht vollständig vom Celluloseträger gewaschen und befinden sich dort ungebunden. Das restliche Vorhandensein dieser Edukte resultiert aus einem notwendigerweise (vgl. *Kap. 3.4.7*) nur leichten Schütteln bei der Aufreinigung. Für die Celluloseträger der Bibliothek muss dementsprechend das Gleiche gelten wie für die untersuchten Kontrollen. Während des späteren Auflösungsprozesses der Celluloseschnipsel (*Kap. 3.5.3*) sollten jedoch weitere Waschschriffe zu einer vollständigen Entfernung der Amine führen.

Die Charakterisierung der Kontrollsubstanzen belegt das generelle Gelingen der Synthese einer neuen Bibliothek 2,6,9-trisubstituierter Purine. In allen Fällen entspricht der Hauptpeak in der LC/MS Analytik dem Zielprodukt. Dessen Bildung erfolgt häufig in hoher Reinheit. Auf den meisten Trägern wird außerdem das jeweilige Amin der letzten Synthesestufe nachgewiesen. Dieses kann jedoch auf Grund weiterführender Schritte für die Bibliothek vernachlässigt werden.

Die Purinbibliothek wird entsprechend für eine Übertragung in ein bekanntes Mikroarray-Format und anschließende Bindungstests verwendet werden.

3. Substanzbibliothek

Tabelle 14: Struktur synthetisierter Kontrollen unter Angabe des Positionsquadrates

Position	Struktur	Position	Struktur
A		I	
B		J	
C		K	
D		L	
E		M	
F		N	
G		O	
H		P	

3.5 Proteinbindungstests an der Purinbibliothek

Die neu synthetisierte Bibliothek soll verwendet werden, um Interaktionspartner für Proteine zu finden. Werden Treffer (*hits*) aus den 384 untersuchten Purinen gefunden, soll der entsprechende Bindungstest auf einen Faden-Array übertragen werden. So könnte das Prinzip einer diagnostischen Anwendung mit bekannten Bindern auf dem neuen Format aufgezeigt werden. Während die prinzipielle Funktionalität des Faden-Arrays bereits mit bekannten Interaktionspartnern gezeigt werden konnte, würde diese an Hand neu gefundener Binder ebenfalls demonstriert werden.

Für die Suche nach Bindern werden Tests mit verschiedenen Kinasen durchgeführt. Purine weisen ein hohes Potential auf, als Bindungspartner für diese Enzymklasse agieren zu können (vgl. Kap. 3), da sie als ATP-Analoga möglicherweise in die ATP Bindungstasche passen. Beispiele bereits bekannter Kinase bindender Purine sind die in *Abbildung 71* dargestellten CdK1-Inhibitoren Olomoucine, Olomoucine II, Roscovitine und Purvalanol A oder die Src Tyrosinkinase Inhibitoren NVP-AAK980 (Novartis) und AP-2364 (ARIAD Pharmaceuticals) (91).

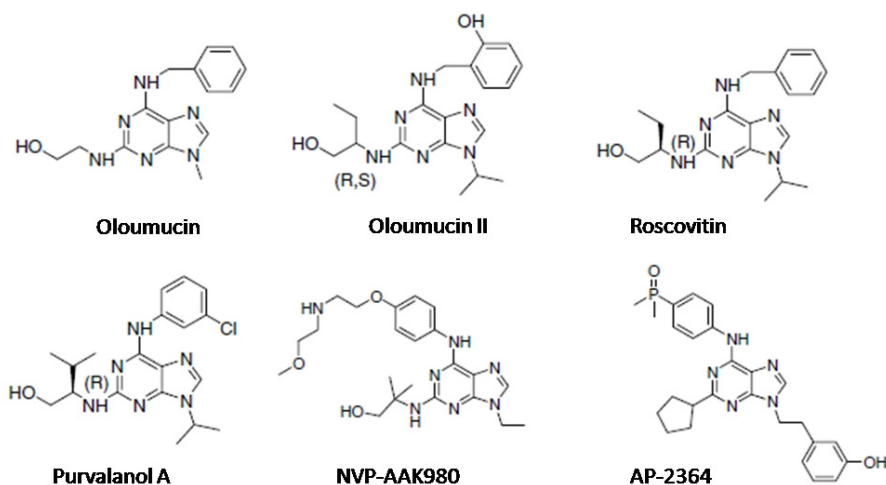


Abbildung 71: Kinaseinhibitoren auf Purinbasis

Für die Übertragung der Bibliothek auf ein bekanntes Mikroarray-Format auf Glasobjektträgern werden die cellulosegebundenen Substanzen mit der festen Phase aufgelöst. Neben der Verwendung des beschriebenen SC²-Prozesses wird auch eine enzymatische Methode der Auflösung der Celluloseträger untersucht. Bei anschließend auf Glaträgern erzeugten Mikroarrays werden für die Proteinbindungstests Kontrollsonden zur Überprüfung jedes Experiments eingesetzt. Zusätzlich zu einer üblicherweise eingesetzten Kontrollsonde soll hier eine neue spezifische Kontrolle etabliert werden.

3.5.1 Enzymatische Auflösung von Cellulose-Spots

Die Auflösung von substanzbeladenen Cellulose-Spots erfolgt im SC²-Prozess (40) durch die Säure TFA (*Kap. 5.3.12*). Im Fall von Peptidbibliotheken ist dies die Methode der Wahl, da eine Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen ohnehin per TFA durchgeführt werden muss. Möchte man allerdings Celluloseträger kleiner organischer Moleküle auflösen, ist dies nur sinnvoll, wenn sich alle Substanzen inert gegenüber der sauren Behandlung verhalten. Weniger harte Bedingungen sollten deshalb den Auflösungsprozess für ein größeres Substanzspektrum zugänglich machen und in seiner Durchführung erleichtern.

Hier wird der hydrolytische Abbau der Celluloseketten durch enzymatische Katalyse getestet. Auf diese Weise aufgelöste Cellulosekonjugate sollen dann auf Glasobjektträger aufgetragen und als Sonde eines Mikroarrays detektiert werden.

3.5.1.1 Einfluss des Lösemittels

Dazu werden zunächst 4 Spots ausgestanzt (vgl. *Kap. 5.3.12*). Auf jedem ist dabei ein Peptid gebunden, welches das 1D3-Bindungs-epitop präsentiert. Dieses Peptid wird hier als Beispiel eines Sondenmoleküls gewählt, da eine solche Auflösung immer substanzkonjugierte Spots betrifft, und nicht unbeladene Celluloseträger. Jeder Spot wird zu 500 µl einer Lösung von 1 Unit Cellulase gegeben (0,5 U/ml). 1 Unit (1 U) entspricht dabei der Menge an Enzym, die 1,0 µmol/h an Glucose freisetzt (Herstellerangaben, getestet bei: pH 5,0, 37 °C, 2 h Inkubation, Sigma Aldrich). Verwendet wird Cellulase aus *Trichoderma viride*, da sich das Enzym aus diesem Organismus in Vorversuchen als dasjenige mit der höchsten getesteten Aktivität gezeigt hat. Vier wässrige Lösungen verschiedener pH-Werte und Inhaltsstoffe werden hinsichtlich der Auflösungsgeschwindigkeit verglichen: TBS (pH 6,5), CBS (pH 7,0), Acetatpuffer (pH 5,0) und gereinigtes Wasser (Milli-Q). Dabei entspricht der pH-Wert im Acetatpuffer dem vom Anbieter verwendeten Wert (s. o.). In Wasser wird ein pH-Wert von 5-6 gemessen. Das saure Milieu ergibt sich dabei durch Spuren von TFA auf Grund einer vorherigen Abspaltung von Seitenschutzgruppen auf dem Spot. Weitere vier Spots werden als Negativkontrollen in den gleichen Lösemitteln ohne Enzymzugabe behandelt. Bei einer Temperatur von 30 °C werden die Proben geschüttelt und nach verschiedenen Zeiten die Auflösung der Spots verglichen. In Wasser ergibt sich bereits nach 24 h eine feine Suspension, in Acetatpuffer nach 7 d, in TBS nach 9 d, während der Spot in CBS auch nach 14 d noch nicht zerfallen ist. Die Kontrollspots verbleiben unverändert. Damit kann eine Auflösungszeit für einen Spot entsprechend der Dauer bei der Auflösung nach dem SC²-Prozess erreicht werden. Allerdings wird hier nur eine Suspension feiner Partikel erhalten, die auch nach länger andauernder Behandlung nicht in Lösung übergehen.

Die höchste Aktivität bei den untersuchten Bedingungen zeigt das Enzym in reinem, ungepuffertem Wasser. Wie auch bei den Aktivitätstests seitens des Enzymherstellers liegen auch hier leicht saure Bedingungen vor. Weitere Versuche werden daher in Wasser als Medium durchgeführt.

3.5.1.2 Einfluss der Behandlungsdauer

Bei der Auflösung eines 1D3-Peptid haltigen Spots innerhalb von 24 h wird nur eine Suspension feiner Partikel erhalten (*Kap. 3.5.1.1*). Daher soll der Einfluss der Behandlungsdauer untersucht werden. Gleichzeitig wird die Funktionalität auf daraus erhaltenen Mikroarrays getestet. Die Mikroarrays werden, abgesehen vom Auflösevorgang, nach dem SC²-Prozess (*Kap. 5.3.12*) erzeugt. Um zu testen, ob die gebundene Substanz auf dem Träger einen Einfluss auf den enzymatischen Abbau hat, werden nun Spots mit anderen Substanzen als dem schon getesteten Peptid untersucht.

Die genaue Durchführung wird in *Kapitel 5.8.1* beschrieben. Je ein Biotin- und ein Desthiobiotin haltiger Spot werden eingesetzt. Beide können als Sondenmolekül durch Bindung zum Protein Streptavidin detektiert werden. Für die Verbindung ohne Schwefelatom ist dabei eine geringere Bindungsaffinität ($K_d = 10^{-12}$ M) bekannt (106). Jeder Träger wird in einer Lösung von 2 U/ml Cellulase in Wasser geschüttelt. Die Behandlungsdauer beträgt 30 Tage bei 30 °C. Zu 20 verschiedenen Zeitpunkten wird je ein Teil der Suspension abgenommen und das enthaltene Enzym deaktiviert. Dazu wird die abgenommene Lösung im erhitzten Ultraschallbad behandelt (60 min, 70 °C) und anschließend bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Ein kompletter Zerfall des jeweiligen Celluloseträgers ergibt sich nach 7 d. Die Größe der Fasern in der erhaltenen Suspension nimmt mit fortschreitender Behandlung langsam ab. Auch nach 30 Tagen ist jedoch keine vollständige Auflösung erfolgt. Alle 20 genommenen Proben eines Trägers werden direkt im Nanolitervolumen mit einem Mikroarray-Drucker nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.13*) auf Glasobjektträger übertragen. Dazu werden die erhaltenen Stammlösungen zuvor 1:1 in einer Mikrotiterplatte mit dem entsprechenden Lösemittel verdünnt. Aus jeder der 20 Proben werden vier Spots auf dem Glas Slide generiert (*Abbildung 72*). Anschließend wird ein Proteinbindungstest mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin-Cy3 durchgeführt (*Kap. 5.3.14*). Das Diagramm in *Abbildung 73* zeigt die per Software ermittelte (Phoretix Array analysis software, Phoretix International, Newcastle, UK) Spotintensität in Bezug auf die Behandlungsdauer des Biotinspots.

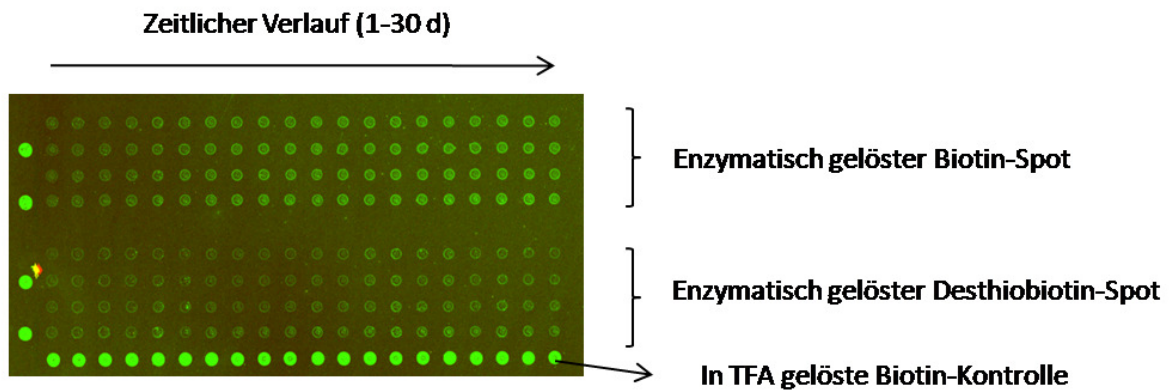


Abbildung 72: Gescannter Mikroarray (Ausschnitt) nach Inkubation mit Streptavidin-Cy3; (Nicht-lineare) Zunahme der Behandlungsdauer des Cellulose-Spots entlang der Zeilen auf dem Array; Zeile 1-4: Biotin, Zeile 5-8 Desthiobiotin; Kontrollen am Rand: Biotin nach Auflösung über SC²-Prozess

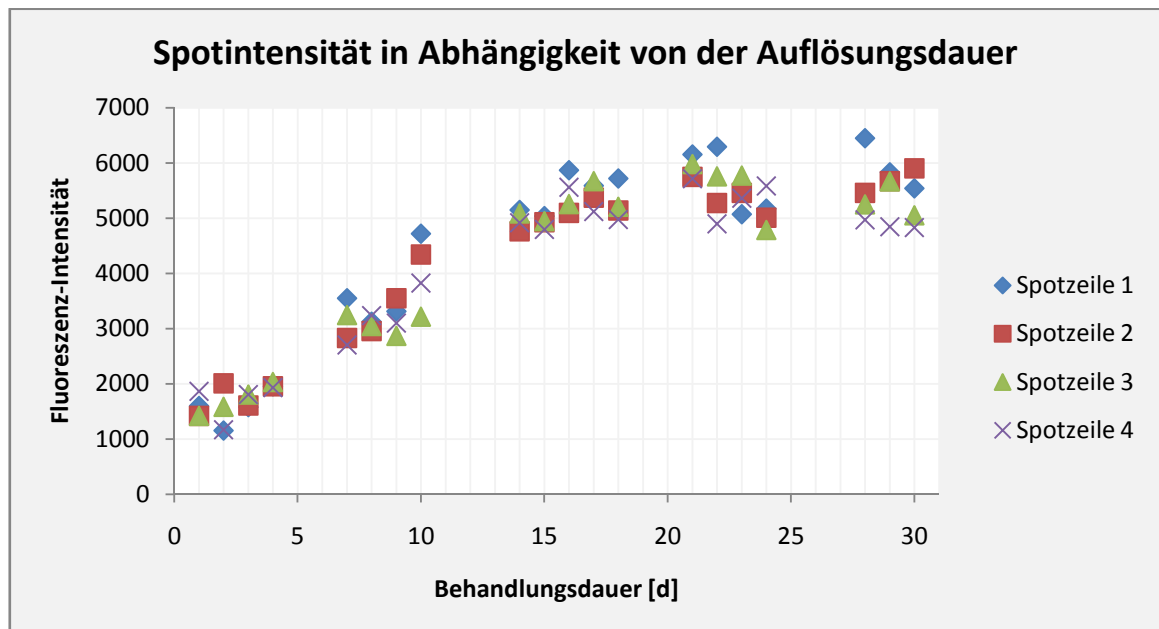


Abbildung 73: Auftragung der ermittelten Spotintensität für Biotin über der Behandlungsdauer

Wie das Diagramm verdeutlicht, ergibt sich in den ersten 2 Wochen eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität. D. h. durch die enzymatische Auflösung steigt die Konzentration gelösten, cellulosegebundenen Biotins an. Eine signifikante Veränderung nach weiterer Behandlung kann nicht beobachtet werden. Obwohl der Spot nach sieben Tagen komplett zerfällt und sich eine Suspension bildet, wird die maximale Intensität erst nach etwa 14 Tagen erreicht. Dies zeigt, dass sich die Sonde durchgängig auf dem Cellulosenetzwerk und nicht nur auf der äußeren Oberfläche befindet.

Im Gegensatz zu 1D3 haltigen Cellulose-Spots (*Kap. 3.5.1.1*) ergibt sich hier der komplette Zerfall erst nach einigen Tagen, obwohl das Enzym in doppelter

Konzentration eingesetzt wird. Die Auflösung durch Cellulase ist demnach stark von der gebundenen Substanz abhängig. Außerdem zeigt sich im Fall der Biotin-Spots, dass durch die Auflösung mit TFA (Kontrollen in *Abbildung 72*) trotz fünffach höherer Verdünnung eine weitaus höhere Intensität erhalten wird. Möglicherweise resultiert dies aus einem Abbau der Celluloseketten in kleinere Fragmente bei der enzymatischen Behandlung, verglichen mit der Auflösung per TFA. In diesem Fall würde eine Adsorption an die Glasoberfläche (40) der Mikroarrays nicht mehr ausreichend stattfinden. Die cellulosegebundenen Sonden würden dann bei der Durchführung von Proteinbindungstests mehr und mehr vom Glasträger abgewaschen.

Die Möglichkeit einer enzymatischen Auflösung substanztragender Cellulosemembranen als Alternative zum sauren Abbau kann hier gezeigt werden. Ein auf diese Weise aufgelöstes Sondenmolekül kann anschließend im Mikroarray-Format auf Glasobjektträgern nachgewiesen werden. Limitierend für die enzymatische Methode sind jedoch eine hohe Abhängigkeit der Auflösungsgeschwindigkeit von der gebundenen Substanz, und eine geringere resultierende Fluoreszenzintensität der auf Mikroarrays detektierten Signale.

3.5.2 Purvalanol B als Kontrollsonde

Bei der Durchführung von Bindungstests auf Mikroarrays muss in jedem Experiment ein generelles Funktionieren gewährleistet sein. Dazu werden bestimmte Sonden als Kontrollen verwendet. Häufig wird als Positivkontrolle Biotin eingesetzt und im Bindungstest durch fluoreszenzmarkiertes Streptavidin nachgewiesen (40; 44). Als Negativkontrolle kann z. B. β -Alanin eingesetzt werden, um unspezifische Bindung auszuschließen.

Um neben den hochaffinen Bindungspartnern Biotin-Streptavidin eine Kontrolle im zu erwartenden Affinitätsbereich (μM) zu erhalten, soll hier als eine vergleichbare Kontrolle das kommerziell erhältliche (Tocris Bioscience, Bristol, UK) Purvalanol B (PurB) etabliert werden. Diese Substanz ist als Inhibitor für die Kinase ERK1 bekannt (107). Eine Inhibition von 50 % der Kinase (IC_{50}) wird dabei mit $3,3 \mu\text{M}$ angegeben. PurB ist ein 2,6,9-trisubstituiertes Purin (*Abbildung 74*) und stellt somit eine ideale Kontrolle für die Verwendung neben anderen Purinsonden dar (s. Kap. 3.5.3).

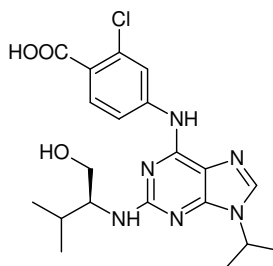


Abbildung 74: Purvalanol B

Für die Etablierung von PurB als Kontrolle wird die Substanz an 4 Cellulose-Spots gebunden. Die genaue Versuchsdurchführung wird in *Kapitel 5.8.2* beschrieben. Die Kopplung geschieht analog einer Aminosäurekopplung (*Kap. 3.1.2*) über die Aktivierung der Carboxylgruppe. An einem der Spots wird ein Capping durchgeführt, um einen eventuell resultierenden Unterschied im Bindungstest zu überprüfen. Einer der nicht gecappten Spots wird enzymatisch aufgelöst. Dazu wird eine im Vergleich zu vorigen Versuchen erhöhte Konzentration von Cellulase in Wasser (6 U/ml) verwendet. Nach 15 Tagen wird eine faserhaltige Suspension erhalten und das Enzym deaktiviert. Die übrigen Spots werden nach dem SC²-Prozess aufgelöst. Alle vier erhaltenen Stammlösungen werden in drei verschiedenen Verdünnungen (1:8, 1:5, 1:3), je in vierfacher Ausführung (Quadruplikat), auf Glasobjektträger gespottet. Ein Proteinbindungstest wird nach der allgemeinen Vorschrift durchgeführt (*Kap. 5.3.14*). Dabei erfolgt die Erstinkubation mit ERK1-GST. Durch eine Zweitinkubation wird an PurB gebundenes ERK1-GST über einen fluoreszenzmarkierten (Cy5) Anti-GST Antikörper detektiert. Weiterhin ist hier Streptavidin-Cy3 enthalten, um die Biotinkontrolle nachzuweisen.

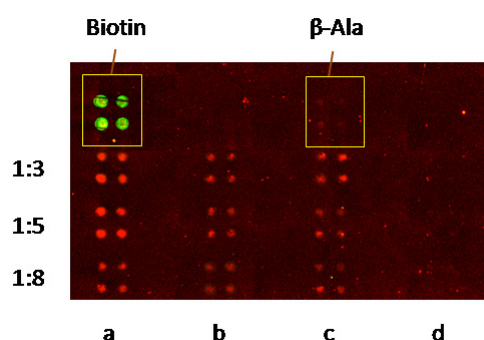


Abbildung 75: Detektion von PurB durch Bindung mit ERK1-GST im Mikroarray-Format; a+b: nach SC²-aufgelöste PurB Cellulose-Spots, c: nach SC² aufgelöster, gecappter Spot, d: enzymatisch aufgelöster Spot; die Stammlösungen werden jeweils als Quadruplikat in drei verschiedenen Verdünnungen aufgetragen; Als Kontrollen werden Biotin (positiv) und β-Ala (negativ) verwendet

Die nach SC² hergestellten Stammlösungen ergeben die zu erwartenden Fluoreszenzen in Abhängigkeit von der aufgetragenen Sondenkonzentration (*Abbildung 75, a, b*). PurB des gecappten Spots wird mit etwa gleicher Intensität detektiert (*c*). Enzymatisch aufgelöstes PurB dagegen kann nicht nachgewiesen werden (*d*). Auch hier könnten dafür möglicherweise beim enzymatischen Abbau entstehende, zu kleine Cellulosekomponenten für eine Ablösung der Substanz verantwortlich sein (vgl. *Kap. 3.5.1.2*). In diesem Fall ist eine adsorptive Haftung durch das Polysaccharid an der Glasoberfläche nicht mehr gegeben.

Purvalanol B ist als Kontrollsonde auf Mikroarrays positiv und selektiv neben anderen Substanzen detektiert worden. Das Purin wird daher in späteren Bindungstests als Kontrolle verwendet. Eine Detektion nach enzymatischer Erstellung der Stammlösung konnte nicht gezeigt werden. Diese Art der Auflösung wird entsprechend nicht weiter verwendet.

3.5.3 Herstellung von Purin-Mikroarrays auf Glas Slides

An Hand der erstellten Purinbibliothek sollen neue Binder für Kinasen gefunden werden. Dazu wird die Substanzsammlung in ein Mikroarray-Format auf Glasobjektträgern überführt. Die Überführung erfolgt nach dem in *Kapitel 5.3.12 & 5.3.13* beschriebenen SC²-Verfahren (40). Jedes Positionsquadrat wird dazu diagonal halbiert. So wird eine Fläche von der Größe eines Spots erhalten (0,10 cm²). Es wird je nur eine solche Hälfte in jedes Röhrchen eines Matrix-Racks gegeben (*Abbildung 76*), da der SC²-Prozess auf die Verwendung von Spots dieser Größe angepasst ist. So werden je vier 96er Racks mit 384 Trägerhälften *CnC.4* bestückt. Die Gestelle 5-8 beinhalten folglich die gleichen Substanzen wie die Racks 1-4 und werden als Sicherung gelagert.

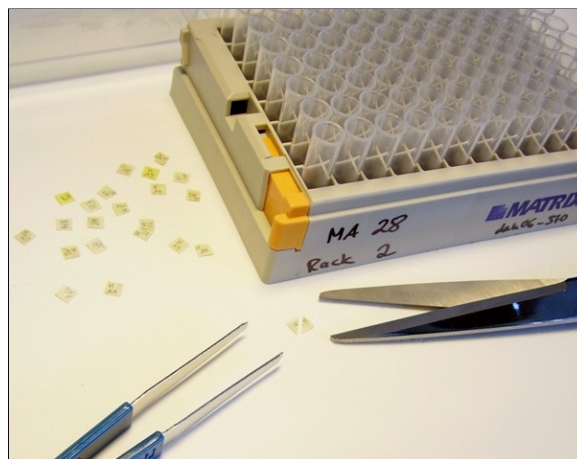


Abbildung 76: Halbierung von Positionsquadraten und Verteilung der Träger auf 96er Racks

Alle Röhrchen tragen einen Barcode, der eingelesen, und die Zuordnung der Substanzen somit katalogisiert wird. Die Träger der ersten vier Racks werden aufgelöst. Verwendet wird dazu das in *Kapitel 3.4.1* ermittelte Auslösungsreagenz. Bei Schütteln über Nacht gehen fast alle Cellulosehälften in Lösung. Alle Membranschnipsel der Spalten 12+24 aus der Cut & Combine Synthese verbleiben zunächst ungelöst. Den zugehörigen Substanzen ist hier der 2-Nitrilobenzylrest gemeinsam (vgl. *Kap. 3.4.6, Tabelle 12*). Auch die Geschwindigkeit der sauren Auflösung ist folglich von den auf der Cellulose gekoppelten Verbindungen abhängig. Nach einer anschließenden Behandlung im Ultraschallbad werden vollständige Lösungen aller 384 Komponenten erhalten. Für eine Aufreinigung werden die Cellulose-Purin Konjugate mit Ether gefällt und gewaschen. Die festen Rückstände werden in je 500 µl DMSO gelöst und ergeben so die Stammlösungen der Purinbibliothek. Eine Langzeitlagerung findet nach Schockgefrieren bei -20 °C statt.

Anteile aller Stammlösungen werden in Mikrotiterplatten im Verhältnis 1:5 mit DMSO verdünnt und nach einem vorher bestimmten Layout (*Abbildung 77*) auf modifizierte Glasobjektträger (AIMS Scientific Products) gespottet. Dabei wird jede Lösung als Triplikat aufgetragen. So sollen bei späteren Bindungstests Falschpositive Signale identifiziert werden. Richtigpositive Signale erscheinen dreifach. Die 384 Sonden werden auf zwei Hälften zu je vier Spalten verteilt. Jede Spalte enthält 48 Substanzen. Die drei Replikate einer Verbindung sind dabei jeweils nebeneinander in gleicher Zeile angeordnet.

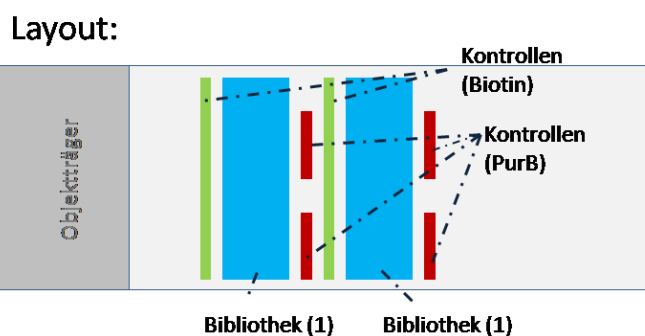


Abbildung 77: Layout von Purinbibliothek (blau) und Kontrollen (grün: Biotin, rot: PurB) auf Glasobjektträgern

Unter Einsatz des modifizierten, TFMSA haltigen Auflösungsreagenzes können hier die Celluloseträger der Purinbibliothek nach dem SC²-Prozess aufgelöst werden. Damit wird eine mögliche Verwendung dieses säurestabilisierten Trägermaterials für entsprechend zu verarbeitende Bibliotheken belegt. Die erzeugten Stammlösungen werden erfolgreich für die Erstellung von Purin-Mikroarrays auf Glasobjektträgern verwendet.

3.5.4 Bindungstests von Kinasen an der Purinbibliothek

Die Kinasenbindungstests werden hier an der generierten Purinbibliothek auf Glas-Slide-Mikroarrays durchgeführt. Dabei werden nacheinander verschiedene Kinasen untersucht. Alle Enzyme werden als GST-Fusionsprotein eingesetzt. Gefundene Binder (Purinsonden) können so im Falle einer Interaktion zu der entsprechenden Kinase über einen fluoreszenzmarkierten Anti-GST Antikörper nachgewiesen werden. Die Verwendung von PurB als Kontrolle ist mit der Detektion durch ERK1-GST daher ein direkter Nachweis für die Funktionalität dieses Sekundärantikörpers.

Die Durchführung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift für Proteinbindungstests (*Kap. 5.3.14*). In jedem Fall werden 2 Mikroarrays auf die gleiche Weise behandelt, um die Gleichheit der Ergebnisse überprüfen zu können. Ein zusätzlicher Slide wird in der Erstinkubation ohne das betreffende Protein behandelt. Dieser dient als Negativkontrolle. Die Objektträger werden zunächst mit einem Blockierungspuffer behandelt, um unspezifische Bindungen der Probe an die Oberfläche durch Absättigung zu unterdrücken (vgl. *Kap. 2.3 & 0*). In der Erstinkubation wird die jeweilige Kinase in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Zusätzlich enthält die Lösung in gleicher Konzentration die Kinase ERK1-GST zur Detektion der Kontrollsonde PurB. In einer Zweitinkubation wird der markierte (Cy5) Anti-GST Antikörper (5 µg/ml) neben dem Biotinbinder Streptavidin-Cy3 (5 µg/ml) verwendet.

3.5.4.1 Einfluss von Blockierungspuffern

Das Layout des verwendeten Mikroarrays wird in *Abbildung 77 (Kap. 3.5.3)* dargestellt. In einem ersten Test wird als Kinase lediglich ERK1-GST eingesetzt, um eine eventuelle Bindung zu einer der Purinsonden zu überprüfen. Eine entsprechende Bindung wird jedoch nicht gefunden. Auffällig ist eine hohe Hintergrundintensität im roten Kanal (*Abbildung 78, a*). Die rot dargestellte Fluoreszenz ergibt sich durch den am Sekundärantikörper konjugierten Farbstoff Cy5. Demnach binden entweder die Kinase oder der Anti-GST Antikörper unspezifisch auf der Glasoberfläche. Das Fehlen dieser Hintergrundfluoreszenz auf dem Kontroll-Slide belegt (*b*), dass es sich nicht um die Bindung des Antikörpers handelt. Folglich bindet die Kinase ERK1 unspezifisch an die Oberfläche.

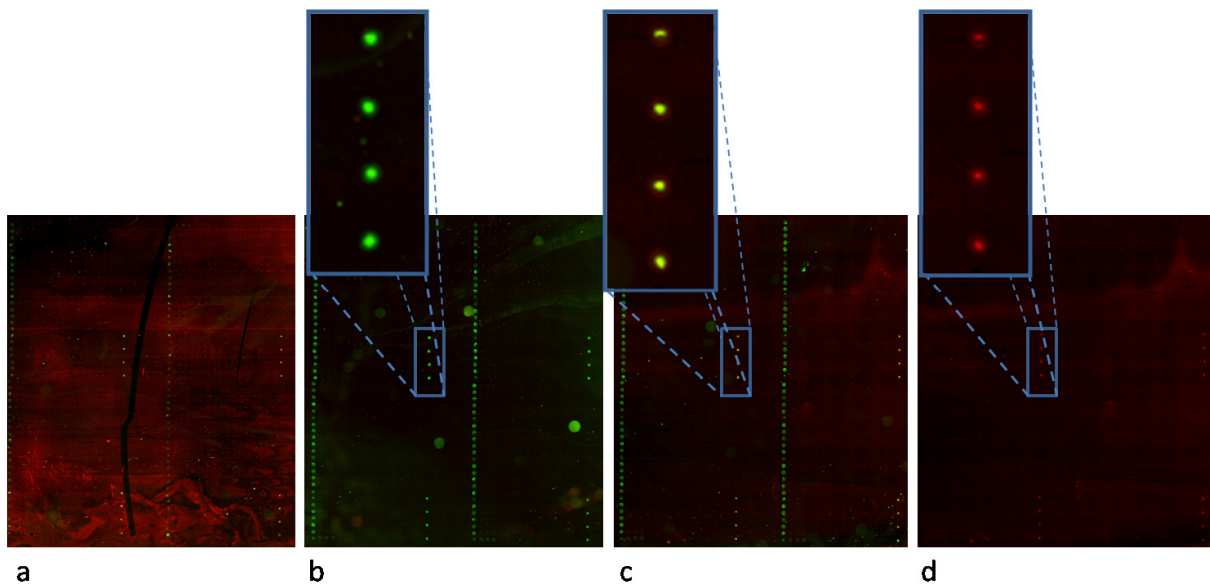


Abbildung 78: Scan von Purin-Mikroarrays nach ERK1-Bindungstests; a: geblockt mit BSA, b: Kontrolle ohne ERK1, c: geblockt mit Milchpulver, d: geblockt mit Milchpulver (nur Cy5 Kanal); hervorgehoben sind je Slide vier der 4 x 4 PurB-Kontrollspots

Bei Verwendung der gleichen hohen Blockierungsdauer (12 h) wird derselbe Test an einem weiteren Mikroarray gleichen Aufbaus durchgeführt. Als Blockierungsreagenz wird statt des standardmäßig verwendeten BSA (40) nun Milchpulver in PBS (4 %) eingesetzt. Auf diese Weise kann hier eine weitaus geringere Hintergrundintensität durch unspezifische Bindung der Kinase (*Abbildung 78, c*) erzielt werden.

Obwohl der Kontroll-Slide ohne die Kinase behandelt wird, zeigt sich ein Fluoreszenzsignal an den PurB Kontroll-Spots (*b*). Die Darstellung in grüner Farbe belegt eine Bindung von Streptavidin (Cy3). Bei zusätzlichem Einsatz der Kinase zeigt sich dementsprechend als Mischfarbe ein gelbes Signal (*c*). Einen direkten Nachweis der Kontrolle PurB erhält man durch Ausblendung des grünen Kanals, wobei die reine Bindung von ERK1 als rote Farbe dargestellt wird (*d*). Die zusätzliche Bindung der Kontrollsonde PurB durch Streptavidin kann demnach vernachlässigt werden.

Die erfolgten Versuche belegen die Wichtigkeit der Blockierungsreaktion. Durchführung und Reagenz müssen unter Umständen für jedes Experiment individuell ermittelt werden. Weiterhin wird gezeigt, dass ERK1 mit keiner der Purinsonden eine zu beobachtende Bindung eingeht. Die Bindungspartner PurB-ERK1 können entsprechend als Kontrolle für die Purinbibliothek verwendet werden.

3.5.4.2 Bindungstests verschiedener Kinasen

Insgesamt werden zehn verschiedene Kinasen (s. Kap. 5.8.5) unter den oben beschriebenen Bedingungen getestet. Die verschiedenen Enzyme werden nacheinander in einer Konzentration von 10 µg/ml hinsichtlich einer Bindung zu den Purinsonden untersucht.

Bei Einsatz der Kinase p38α MAPK ergibt sich an zwei der Purinsonden ein Bindungssignal (Abbildung 79, a+b). Diese Kinase ist Teil einer zellulären Signalkaskade im Zusammenhang mit Stress (108).

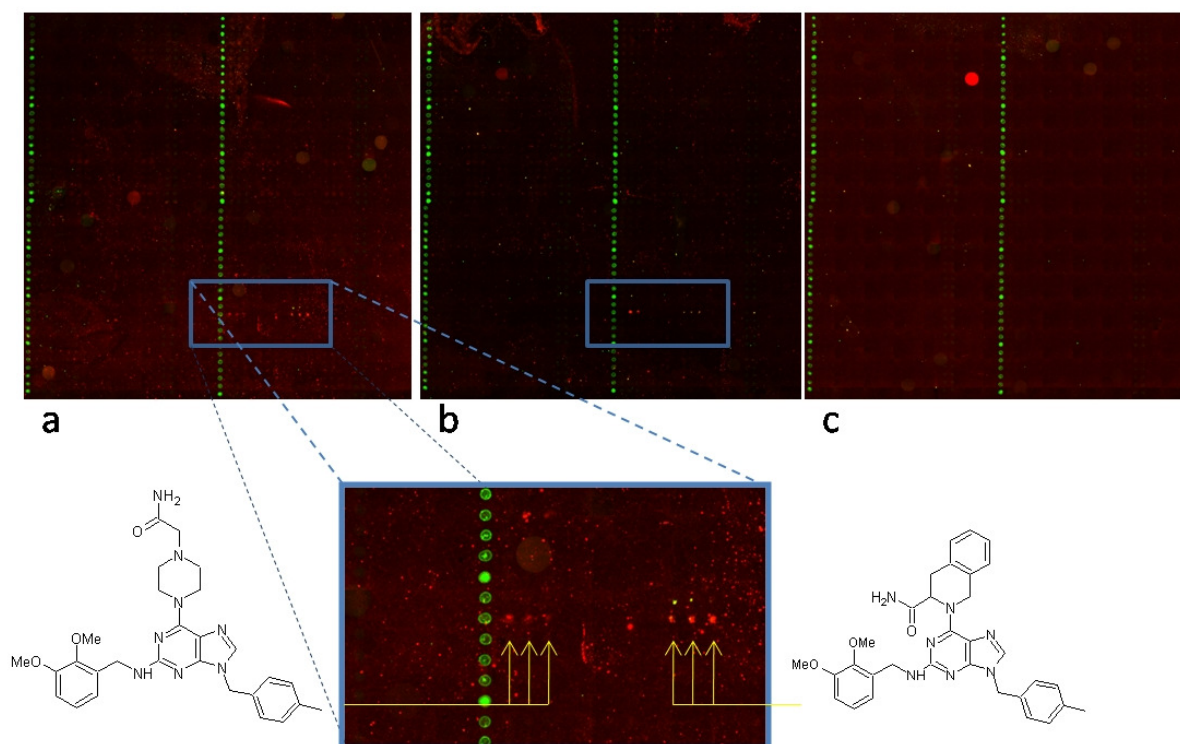


Abbildung 79: Bindungstest an Purin-Mikroarray mit der Kinase p38α MAPK-GST; a+b: auf gleiche Weise getestete Glas Slides, c: Kontroll Slide ohne Verwendung der Kinase

Je Bindungssignal fluoreszieren alle drei Triplikate der Substanz. Auf dem Kontroll Slide (Behandlung ohne Einsatz der Kinase) treten die Signale nicht auf (Abbildung 79, c). Die zu den fluoreszierenden Spots gehörigen Purinderivate unterscheiden sich lediglich in der Aminosäure an C-6 des Puringrundgerüsts. Die Substituenten an den Diversitätspunkten R_2 und R_3 sind dagegen identisch. Diese molekulare Ähnlichkeit untermauert die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Bindung zu demselben Enzym. Weiterhin sprechen die Fluoreszenz auf dem jeweils gesamten Triplikat, und das Fehlen der Fluoreszenz auf dem Kontroll Slide für die Echtheit der gefundenen Interaktion.

In der Literatur (109) liegen bereits Daten über einen Komplex von p38α mit einem anderen Purinliganden vor. Jener Komplex ist über Kristallstrukturanalyse

charakterisiert worden, so dass sich zu einer ersten Unterstützung der zwei hier experimentell gefundenen Interaktionen ein Strukturvergleich durch Docking-Berechnungen anbietet. Die frei verfügbaren Daten der zugrunde gelegten dreidimensionalen Struktur werden dazu aus der Protein Data Bank (pdb) entnommen (110). Verwendet wird der Komplex mit dem pdb-Code 2GTM. Die Struktur besteht aus dem Komplex der betroffenen Domäne von p38 α in Verbindung mit dem Inhibitor PG-892579 (*Abbildung 80*). Dieser Komplex eignet sich besonders gut als Docking-Grundlage, da der enthaltene Ligand ebenfalls ein aromatenhaltiges Purin darstellt. Eine errechnete Interaktion zu der Kinase sollte für die zwei gefundenen Hits größer ausfallen als für Purine, bei denen im Experiment keine Bindung zu dem Enzym detektiert werden konnte.

Der in dem bekannten Komplex vorhandene Ligand PG-892579 soll dabei in der Bindetasche des Enzyms durch die hier zu untersuchenden zwei Purinliganden bzw. zwei im Experiment nicht bindende Purine ausgetauscht werden. Die Berechnungen liefern sowohl Informationen über die wahrscheinlichste Orientierung der kleinen Moleküle in der Bindungstasche, als auch relative Daten über die Qualität der jeweiligen Protein-Ligand Bindung.

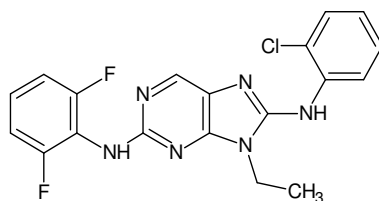


Abbildung 80: PG-892579, Inhibitor der Kinase p38

Bei dem Docking werden die zwei durch das Screening gefundenen Hits mit zwei der dort nicht bindenden Sonden der Bibliothek hinsichtlich ihrer Bindungsstärke zu der Kinase verglichen. Letztere gelten damit als Negativkontrollen in der computergestützten Berechnung. Die Kontrollen werden als strukturell ähnlich gewählt und unterscheiden sich zu den Hits lediglich durch den Aminosäurerest an der 6-Position des Puringerüsts (*Abbildung 81*).

Da jedes der synthetisierten Purine über ein Molekül β -Alanin als Spacer an die Cellulose gebunden vorliegt (vgl. Kap. 3.3.2), werden die Docking-Berechnungen entsprechend mit den Spacer haltigen Substanzen durchgeführt. In *Abbildung 81* werden die β -Alanin Reste aus Gründen der Übersichtlichkeit jedoch nicht dargestellt.

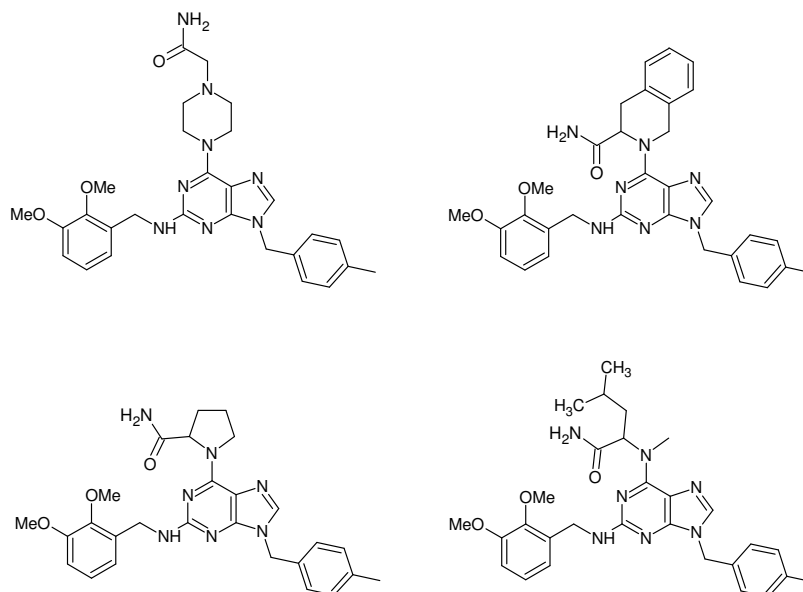


Abbildung 81: Struktur der im Screening identifizierten p38-Binder (Hit 1, Hit 2) neben strukturell ähnlichen Purinen aus der Bibliothek (Negativ 1, Negativ 2)

Eine Darstellung des Originalliganden PG-892579 in der Bindetasche gibt *Abbildung 82, a* wider. Für die vier zu untersuchenden Purine wird die im Docking als wahrscheinlich bestimmte Anordnung der einzelnen Purine in der Bindetasche (*Abbildung 82, b-e*) gezeigt.

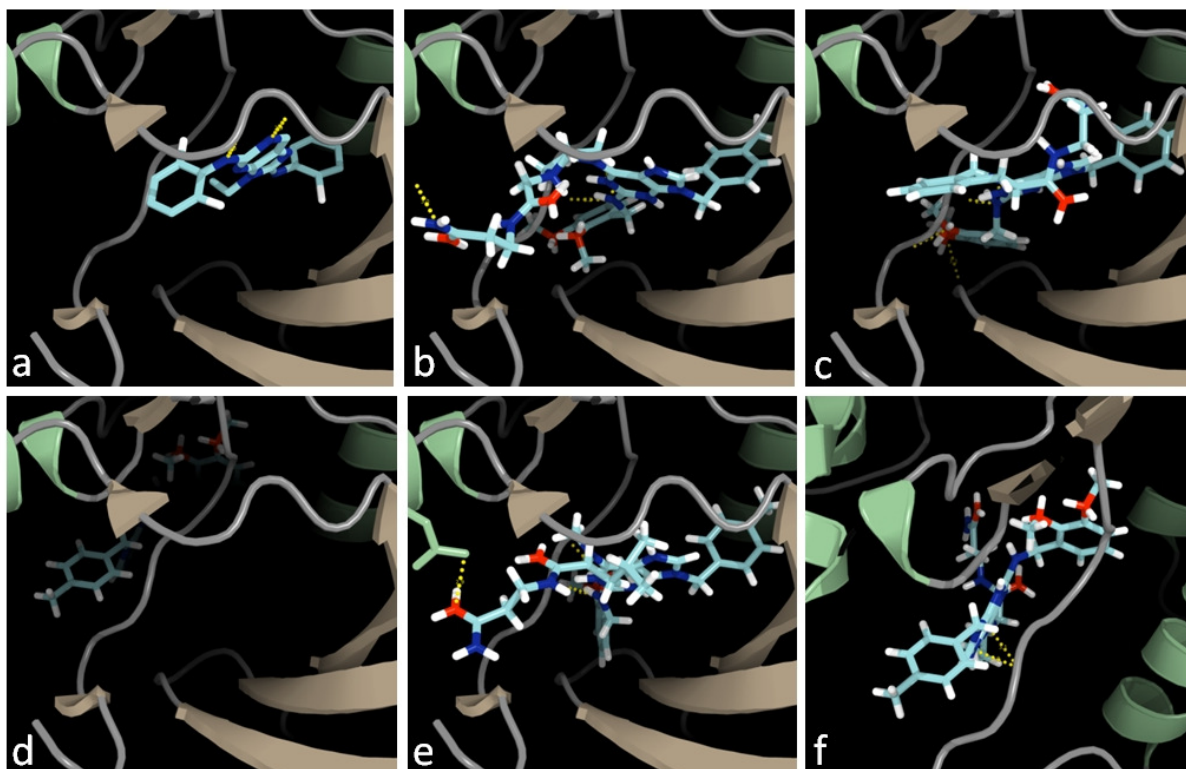


Abbildung 82: Darstellung der Purine in der Bindetasche von p38 α als Resultat von Docking-Rechnungen. Wasserstoffbrückenbindungen werden in gelb wiedergegeben; a: Originalligand PG-892579, b: Hit 1, c: Hit 2, d: Negativkontrolle 1, e: Negativkontrolle 2; f: Negativkontrolle 1 in angepasster Perspektive

In der *Abbildung 82 (b-e)* werden die vier Purine in jeweils gleicher Perspektive des Proteins dargestellt. Für die Negativkontrolle 1 (*d*) ergibt die Berechnung jedoch eine andere Lage in der Tasche als bei den übrigen Substanzen. Daher wird diese zusätzlich in einer angepassten Perspektive gezeigt (*f*). Für die räumliche Passlichkeit in die Bindetasche des Enzyms ergeben sich für alle vier Fälle Werte in der gleichen Größenordnung. Charakteristische Unterschiede zeigen sich jedoch für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweiligen Purinen und der Bindetasche von p38 α . *Tabelle 15* gibt die dimensionslosen Daten für die jeweiligen Purine in der Bindetasche wieder (siehe auch *Anhang 17*). Für beide Hits aus dem Microarray-Screening wird eine höhere relative Bindungsstärke durch ausgebildete Wasserstoffbrücken berechnet als für die Negativkontrollen. Die Berechnungen unterstützen also recht gut das experimentelle Ergebnis.

Tabelle 15: relative Daten bezüglich der untersuchten Purine in der Bindetasche

	Passlichkeit	relative Bindungsstärke (H-Bindungen gesamt)	Anzahl H-Brückenbindungen
Hit 1	75,60	1,86	3
Hit 2	64,56	0,95	4
Negativ 1	72,61	0,43	2
Negativ 2	62,16	0,61	3

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Mikroarrays erlauben eine schnelle Simultan-Analyse einer Vielzahl von Substanzen. Daraus resultiert für die Anwendung in der medizinischen Diagnostik ein Zeitersparnis bei der Untersuchung von Patientenproben. Weiterhin ergibt sich eine Einsparung von Reagenzien- und Materialkosten durch die hohe Miniaturisierung. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Herstellung von Mikroarrays mit Hinblick auf den klinischen Einsatz. Durch die neue Methode des Faden-Arrays sollen gegenwärtige Hürden für eine routinemäßige Anwendung, wie hohe Kosten und mangelnde Reproduzierbarkeit, umgangen werden. Dazu sollen aus einem einzigen Vorläufer eine Vielzahl von identischen Exemplaren des Arrays erhalten werden. Daraus ergibt sich eine kostengünstigere Fertigung, wobei gleichzeitig eine ausreichende Reproduzierbarkeit erreicht wird.

Für die Herstellung von Faden-Arrays sollen Fäden mit daran gebundenen Sondenmolekülen zu einem Bündel verdreht werden, um daraus einheitliche Querschnitte zu erzeugen. Die so erhaltenen Querschnitte ergeben die identischen Exemplare des Faden-Arrays.

Auf Grund theoretischer Überlegungen wurde als Material für die Fäden Lyocell (Cellulose) ausgewählt. Für die Präsentation von Sondenmolekülen auf Faserquerschnitten ist die Möglichkeit zur Immobilisierung dieser Substanzen essentiell. Nach der erfolgreichen Untersuchung der Fadenstabilität gegenüber nicht-sauren Lösemitteln und Reagenzien ist dazu eine Aminierung des Lyocells durchgeführt und optimiert worden. Für die Funktionalisierung der ungeschnittenen Fäden sind verschiedene Diamine vergleichend über eine Aktivierung der Cellulose an die feste Phase gekoppelt worden. Die Aminierungsausbeute wurde an Lyocellfasern getestet, welche mit diversen Additiven versehen waren. Davon ergab sich die weitaus höchste und reproduzierbare Stoffmenge freier Aminogruppen von $0,25 \mu\text{mol/m}$ an kieselensäurehaltigen Fasern ($\text{SiO}_2\text{Lyocell}$). Neben einer zufriedenstellenden Funktionalität ist die Permeabilität gegenüber den zu immobilisierenden Molekülen erforderlich. Bei Lyocell ohne Zusätzen konnte die Testsonde Biotin nur an der Fadenoberfläche nachgewiesen werden. Die Anbindung erfolgte über eine Amid-Kopplung an die erzeugten Aminogruppen. Auch hier führte erst die Verwendung von $\text{SiO}_2\text{Lyocell}$ zu der gewünschten gleichmäßigen Verteilung des Biotins im Inneren der Faser. Andere Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 g/mol , wie entsprechende Peptide und Farbstoffe, sind ebenfalls erfolgreich hinsichtlich der Diffusion in die Fäden getestet worden. Die

Einlagerung eines ionischen Kontrastmittels konnte allerdings per TEM zumindest nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich der Kopplung und Präsentation von Sondenmolekülen ist durch diese Versuche die Eignung der SiO_2 Lyocell Fasern für die Herstellung eines Faden-Arrays dargestellt worden.

Während die Möglichkeit zur Immobilisierung von Sondenmolekülen essentiell ist, ist eine Direktsynthese von Substanzen auf dem Träger nicht zwingend und nur optional. Hinsichtlich weiterführender Möglichkeiten sind daher dennoch die Synthesen zweier Produkte auf der festen Phase untersucht worden. Das Tripeptid AcKYG und 6-Prolinylpurin konnten danach in guter bis mäßiger Reinheit erhalten werden. Bei den Versuchen zeigte sich, dass Säurelabilität und Handhabbarkeit der Fäden eine Direktsynthese stark limitieren können.

Die Erzeugung von Arrays bestehend aus 7 Sondenpositionen ist erfolgreich durchgeführt worden. Dazu wurden die einzelnen Herstellungsschritte an Hand einer einfachen Laboranordnung untersucht. Die Fäden wurden durch zwei parallele Lochplatten geführt und gestrafft. Durch Rotation einer der Platten konnte ein Bündel der Fäden erhalten werden, welches mit einem gefrierbaren Einbettmedium versehen und so fixiert wurde. Daraus sind Querschnitte mit einem Kryo-Mikrotom erzeugt, und diese als Arrays auf Objektträgern abgelegt worden. Nach entsprechenden Tests ist für 7er Faden-Arrays eine notwendige Schnittdicke von 50 μm ermittelt worden. Unterschiedlich modifizierte Objektträger wurden hinsichtlich der Haftung der Schnitte untersucht. Dabei lieferten Slides mit einer NHS-Aktivester haltigen Oberfläche das beste Ergebnis. Eine Ablösung einzelner Fadenquerschnitte bei biologischen Tests konnte bisher auch mit diesen Trägern nicht vollständig unterbunden werden.

Sowohl mit dem Sondenmolekül Biotin, als auch mit einem bekannten Peptid-Epitop als Sonde sind 7er Faden-Arrays für Proteinbindungstests generiert worden. In beiden Fällen konnte die spezifische Detektion der Sonde durch Bindung zu einem fluoreszenzmarkierten Protein gezeigt werden. Mit diesen Versuchen ist die prinzipielle Funktionalität des neuen Faden-Arrays somit erfolgreich belegt worden.

Identische Exemplare eines Faden-Arrays können nur erhalten werden, wenn das erzeugte Fadenbündel eine homogene Struktur aufweist. Sondenmoleküle müssen dazu entlang der Bündelachse in möglichst gleichbleibender Stoffmenge präsentiert werden. Diese Homogenität kann hier an fünf auseinanderliegenden Bündelabschnitten erfolgreich dargestellt werden. Dazu wurden jeweils die Querschnitte erzeugt, und die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten nach Bindungstests verglichen. Intensitäten gleicher Größenordnung belegten dabei die

Homogenität innerhalb eines solchen Faden-Arrays. Die beschriebenen Versuche sind an 7er Arrays durchgeführt worden. Eine Erhöhung der Anzahl an Sondenpositionen des Faden-Arrays auf 19 war bislang auf Grund technischer Schwierigkeiten wenig erfolgreich.

Ein diagnostischer Mikroarray kann bereits aus wenigen Sondenpositionen bestehen. Die verwendeten Sondenmoleküle und die damit nachzuweisenden Biomarker sind dabei in der Regel bekannt. Sollen neue Moleküle als potentielle diagnostische Sonden gefunden werden, erfolgt dies hingegen durch Testen großer Substanzsammlungen. In dieser Arbeit sollte dazu eine neue Molekülbibliothek synthetisiert werden. Die Substanzen sollten anschließend bezüglich der Wechselwirkung zu bestimmten Testproteinen untersucht werden. Gefundene Sonden würden dann auf dem Format des Faden-Arrays zur wiederholten Detektion des Testproteins gekoppelt.

Als Beispiel potentiell diagnostisch einsetzbarer Sondenmoleküle sind Purine gewählt worden. Diese Substanzklasse zeigt eine große biologische Verbreitung und weißt so ein hohes Potential auf, Proteine als Bindungspartner zu finden. Unter Nutzung von 3 Diversitätspunkten pro Molekül wurde eine Synthesestrategie für 2,6,9-trisubstituierte Purine an planarer Cellulose als Festphase entwickelt. Die einzelnen Reaktionsstufen sind zunächst an Hand der Synthese eines einzelnen Purinmoleküls optimiert worden. Dabei wurde als 1. Diversitätspunkt eine Fmoc geschützte Aminosäure an die feste Phase gebunden. Eine erste Quantifizierung konnte so über die anschließend abgespaltene Schutzgruppe durchgeführt werden. Das anschließend an die Aminosäure gekoppelte Purinderivat wurde an der N-9 Position benzyliert und an C-2 mit Benzylamin umgesetzt (Diversitätspunkte 2 und 3). Für jeden der drei Kopplungsschritte an das Puringerüst konnten durch Einsatz eines Mikrowellenofens besonders kurze Reaktionszeiten bei hohem Umsatz erzielt werden. Dabei bestand die Kopplung der Substanz an den Träger jederzeit über ein säurelabiles Linkermolekül. Dieses wurde auf Grund der geeigneten Kombination zur dazu orthogonalen Fmoc-Schutzgruppentechnik gewählt. Für die Charakterisierung ist Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie eingesetzt worden.

Nach der erfolgreichen Reaktionsoptimierung sollten die ermittelten Bedingungen auf einen kombinatorischen Ansatz zur Generierung der Substanzbibliothek übertragen werden. Hier ergaben sich bei Verwendung der SPOT-Methodik im Mikrowellenofen wegen der Flüchtigkeit einiger Bausteine teilweise Schwierigkeiten in der technischen Umsetzung. Mit der ebenfalls für Cellulosemembranen etablierten Cut & Combine Technik konnte jedoch die Synthese einer neuen Bibliothek von

384 verschiedenen Purinen erfolgreich durchgeführt werden. Für gleichzeitig synthetisierte Kontrollsubstanzen ergab sich das Zielprodukt durchschnittlich in hoher Reinheit.

Um Binder für zu testende Proteine zu finden, sollte die Bibliothek zunächst in Stammlösungen überführt werden. Als neue Überführungsmethode ist zuvor die Durchführung einer enzymatischen Auflösung der festen Phase untersucht worden. Hier konnte eine generelle Verwendbarkeit von auf diese Weise gelösten Cellulose-Biotinkonjugaten durch Bindungstests gezeigt werden. Bedingt durch eine hohe Substanzabhängigkeit der Enzymaktivität wurde diese Methode der Trägerauflösung jedoch nicht weiter verfolgt. Die Stammlösungen der Bibliothek konnten letztendlich erfolgreich über den SC²-Prozess erhalten werden. Dazu ist nach entsprechenden Versuchen das bisher verwendete saure Auflösungsreagenz durch die Supersäure TFMSA ergänzt worden. Erst diese Anpassung ermöglichte die Auflösung der notwendigerweise eingesetzten, säurestabilisierten Membranen. Aus den Stammlösungen sind dann Mikroarrays in einem bekannten Format auf Glasobjektträgern hergestellt worden. Neben den 384 Purinen wurden hier Biotin und Purvalanol B als Kontrollsonden aufgetragen. Letzteres ist wie die Sonden der Bibliothek ein 2,6,9-trisubstituiertes Purin und stellt daher eine ideale Kontrollsonde im Hinblick auf eine spezifische Proteinbindung innerhalb der Purinbibliothek dar. Auf Grund des hohen Potentials von Purinderivaten als Liganden für die ATP-Bindetasche von z.B. Kinasen zu fungieren, sind entsprechend verschiedene Enzyme dieser Klasse untersucht worden. Im Fall der Kinase p38 α MAPK konnte dabei die Bindung zu zwei strukturell ähnlichen Purinen detektiert werden. Eine Unterstützung des experimentellen Ergebnisses konnte durch anschließende, computergestützte Docking-Berechnungen geliefert werden.

Auf eine Übertragung auf das Format des Faden-Arrays ist auf Grund der geringen Anzahl von zwei gefundenen Purinliganden für ein Testprotein und der experimentellen Problematik verzichtet worden.

Erste Schritte für Herstellung und Verwendung eines neuen Mikroarray-Formates konnten hier somit erfolgreich erarbeitet werden. Für eine routinemäßige Anwendung sind jedoch weitere Optimierungen des Verfahrens erforderlich.

4.2 Ausblick

Nachdem die Erzeugung von 7er Faden-Arrays erfolgreich gezeigt werden konnte, sollte nun in einem nächsten Schritt eine Verbesserung der hexagonalen Anordnung in 19er Arrays angestrebt werden. Ziel ist die Herstellung von Arrays mit mehreren hundert Sondenpositionen. Dazu wird ein professionelles Gerät zur Durchführung einer optimierten Bündelungstechnik benötigt. Einen weiteren Fortschritt könnte die Untersuchung bisher nicht berücksichtigter Fasermaterialien bieten, wobei die mechanische Stabilität einen entscheidenden Faktor darstellt. An erzeugten Faserbündeln könnten andere Einbettmedien, wie polare, polymerisierende Kunststoffe (z. B. HEMA) mit Hinblick auf eine verbesserte Fixierung auf z.B. Glasoberflächen getestet werden. Dazu muss entsprechend auch eine geeignete Mikrotomtechnik für den Schneidevorgang solcher Kunststoffblöcke zur Verfügung stehen. Alternativ kann auch auf eine örtlich definierte Anordnung der Faserquerschnitte verzichtet werden. Dazu bietet die für das „one bead one compound“ Verfahren (55) verwendete Farbcodierung eine Möglichkeit. Hier werden zusätzlich zu den Sondenmolekülen mehrere Farbstoffe auf den Trägern immobilisiert. Über deren Intensitätsverhältnis erfolgt die Zuordnung der Sonden. Verschiebungen der Fäden beim Bündel- oder Schneideprozess könnten dann vernachlässigt werden.

Bei der Durchführung von Proteinbindungstests an den gefertigten Faden-Arrays muss weiterhin die Haftung der Querschnitte auf dem Objektträger verbessert werden. Hier können einerseits andere Oberflächen, wie klebstoffhaltige oder hoch adhäsive Träger, untersucht werden. Vielversprechend scheint auch eine poröse, aber stabile Abdeckung des Faden-Arrays, die die Lyocellschnitte mechanisch auf dem Träger arretiert. Analyt- und Waschlösungen könnten so trotzdem über Kapillarkräfte oder Diffusion auf das Array einwirken. Für eine weiterführende Darstellung der Funktionalität des Faden-Arrays, bietet sich der Einsatz in einem diagnostischen Test an. Beispielsweise könnte über die Kopplung und Präsentation antigener Peptidsonden der serologische Nachweis von Antikörpern Hepatitis B immunisierter Personen durchgeführt werden. Ein entsprechendes Epitop ist kürzlich auf Mikroarrays einer Peptidbibliothek auf Glasobjektträgern nachgewiesen worden (111).

Eine Purinbibliothek zur Findung potentieller Sondenmoleküle für die Diagnostik ist in dieser Arbeit mit Erfolg kombinatorisch synthetisiert worden. An Hand der dafür eingesetzten Cut & Combine Methode bietet sich die Herstellung weiterer Purine nach dem erarbeiteten Konzept an. Einerseits durch diese Vergrößerung der Bibliothek, und andererseits durch anzustrebende Bindungstests an weiteren

Kinasen oder anderen Proteinen von Interesse, ergibt sich damit eine erfolgversprechende Suche nach neuen Bindungspartnern mit möglicherweise diagnostischem Anwendungspotential. Mittels der Cut and Combine Methode können analog Bibliotheken anderer Substanzen an Cellulosemembranen kombinatorisch synthetisiert werden. Die in dieser Arbeit generierte, oder auch neu herzustellende Substanzsammlungen können neben den erwähnten Bindungstests auch für diverse weitere Fragestellungen der Chemischen Biologie eingesetzt werden. Dazu können die Substanzen auch in gelöster Form verwendet werden, wie man sie nach dem SC²-Verfahren erhält. Beispiele sind die Untersuchung des Einflusses der kleinen organischen Moleküle auf das Wachstum pathologischer Mikroorganismen, oder die Durchführung zellbasierter Tests hinsichtlich phänotypischer Veränderungen. Von besonderem Interesse sind dabei Untersuchungen mit pharmakologischem Hintergrund.

Für die Übertragung gefundener Binder auf das Format des Faden-Arrays, sollte eine entsprechende Methode entwickelt werden. Hier könnten die Stammlösungen aus dem SC²-Prozess eingesetzt werden. Die Purine sind in der jeweiligen Lösung, weiterhin als Konjugate, an partiell hydrolysierte Cellulose gebunden. Daher sollte eine adsorptive Bindung dieser Konjugate, und damit der Purine, an die Cellulosefäden untersucht werden. Dies setzt die Durchlässigkeit der verwendeten Fasern gegenüber den Cellulosekonjugaten voraus. Alternativ bietet sich daher eine kovalente Immobilisierung an, bei der die Substanzen nicht mehr als Konjugate vorliegen. Synthetisiert man jedes Molekül gebunden über die Aminosäure Lysin und ein Linkermolekül an der festen Phase, so lassen sich nach der Abspaltung vom Träger alle Substanzen mit einer freien Aminogruppe am Lysin erhalten. Die chemische Kopplung an aminierte Lyocell Fäden wird dann über Crosslinker, wie Glutardialdehyd, möglich. Für den Einsatz auf dem Format des Faden-Arrays können so kommerzielle oder auch selbst erstellte Bibliotheken auf die Fasern übertragen werden, wenn geeignete chemische Funktionalitäten zur Verfügung stehen.

Bisher existiert nur für die in der Einleitung genannten zwei Mikroarrays eine Zulassung zur Anwendung in der klinischen Diagnostik. Die geringe Anzahl medizinisch verwendbarer Arrays belegt die bisher noch nicht zufriedenstellend gelösten Probleme bei Herstellung und Einsatz, wobei immer noch Reproduzierbarkeit und Richtigkeit die wesentlichen Herausforderungen auf dem Gebiet der Chipdiagnostik darstellen (112).

5 Materialien und Methoden

5.1 Verwendete Geräte und Materialien

Sowohl die Erarbeitung und Optimierung der Synthese kleiner Moleküle als auch die Bibliothekssynthese nach der Cut & Combine Methode werden an säurestabilisierter APEG-Amino-Cellulose als fester Phase durchgeführt. Diese weist 0,6 μmol Aminogruppen pro 1 cm^2 auf. Synthesen nach SPOT-Bedingungen werden auf APEG-540 Fmoc- β -Ala-Cellulose als Träger durchgeführt, welche 1,3-1,5 μmol Fmoc geschützte Aminogruppen pro 1 cm^2 aufweist. Beide Cellulose-träger stammen von der Firma AIMS Scientific Products GmbH (Braunschweig).

Lyocell Cellulosefäden werden vom Thüringischen Institut für Textil- und Kunststoffforschung (TITK) bereitgestellt. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um initialfeuchtes Fasermaterial, dass aus einer Lösung von Cellulose (7,5%; MoDo 488) unter Zusatz von 10 % pyrogener Kieselsäure (SiO_2 ; Degussa AG) bezogen auf Cellulose ersponnen worden ist. Die Durchmesser werden vom Hersteller im Bereich von 70-100 μm angegeben. Die Masse im getrockneten Zustand beträgt hier 3,5 mg/m.

Für mikrowellengestützte Reaktionen wird ein $\mu\text{CHEMIST}$ 1500 der Firma MLS GmbH, Mikrowellen-Labor-Systeme verwendet.

Ein Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H der Fa. Bandelin wird eingesetzt, betrieben bei 35 kHz (450 W).

RP-HPLC/MS-Analytik erfolgt durch Chromatographie unter Verwendung eines Agilent 1000 bzw. 1100 Series Systems (Entgaser G1322A, binäre Pumpe G1312A, thermostatisierbarer Säulenraum G1316A, variabler UV-Detektor G1314A, Automatischer Probengeber PE 200 Serien der Fa. Perkin Elmer) und gekoppelter Single Quadrupol APCI-MS (API 150EX, Applied Biosystems). Verwendet wird eine RP-Säule Gemini, 3 μ , C18, 110A, 50 x 2mm, 3 micron mit Vorsäule. Bei einem Fluss von 0,4 ml/min gilt ein linearer Gradient von 5-70% B von 0-16 min, 70-90% bis 17 min, verbleibend bis 20 min. A = 0,05% TFA/Wasser, B = 0,05% TFA/Acetonitril. Die UV-Detektion erfolgt bei 220 nm.

Zur Durchführung von Synthese nach SPOT-Bedingungen auf Cellulosemembranen wird ein Auto-SPOT Robot ASP 222 der Firma Abimed, bzw. zur Übertragung auf Glasobjektträger ein 427 Arrayer mit 4-Pin-Druckkopf von Affymetrix verwendet. Dabei kommen hydrophile Objektträger von AIMS Scientific Products zur Anwendung. Schnitte von Cellulosefäden für Bindungstests werden auf mit NHS-Aktivestern modifizierten, hydrophilen CodeLinkTM Activated Slides von Amersham

Biosciences bzw. SurModics, Inc. aufgezogen. Für sonstige Kryo-Schnitte werden StarFrost® adhesive Objektträger (Engelbrecht) verwendet.

Die Fluoreszenz an gespotteten Mikroarrays wird mit einem ArrayWorx Biochip Reader der Firma Applied Precision für Cy3- und Cy5-entsprechende Wellenlängen detektiert. Für die Detektion an Fadenquerschnitten wird ein Axioplan-Fluoreszenzmikroskop von Carl Zeiss verwendet. Die Anregung erfolgt über eine Quecksilberlampe durch einen TRITC/Cy3 entsprechenden Filtersatz. Über eine AxioCam derselben Firma erfolgt eine Digitalisierung der Bilder. Wenn nicht anders angegeben, wird eine Belichtungszeit von 500 ms verwendet.

Cellulosefäden werden geschnitten mit einem Mikrotom HM 560 von Microm. Objekt und Messer (Fa. Shandon, Typ MB 35 Premier) und Glasobjektträger werden dabei auf -16 °C gehalten.

Zur TEM-Messung wird ein EM902 (LEO, vorher Zeiss) verwendet, die EELS Spektren werden dabei über ein integriertes Elektronenspektrometer (Castaing-Henri Filter mit magnetischem Doppelprisma und elektrostatischem Spiegel) aufgenommen.

Zur Synthese von Peptiden wird ein Pioneer™ Peptide Synthesis System der Firma Applied Biosystems nach Fmoc-/tert.-Butyl-Schutzgruppenstrategie eingesetzt. Für die anschließende Aufreinigung wird eine präparative HPLC mit einer C18 Säule verwendet (VP250/40 Nucleosil 100-7 C18, Fa. Machery-Nagel). Das System besteht aus einem 2 Kanal online Entgaser, einer HPLC Pumpe K-1800 und einer dynamischen Mischkammer, Firma Knauer. Der UV-Detektor L-4000 von Merck Hitachi arbeitet bei einer Wellenlänge von 220 nm. Bei einem Fluss von 25 ml/min gilt ein linearer Gradient von 5-50% B innerhalb von 0-10 min und ein Anstieg auf 50% bis 70 min. Bei 80 min wird für 10 min mit 100% Methanol gespült. A = 0,1% TFA/Wasser, B = 0,1% TFA/Acetonitril. Die Charakterisierung von Peptiden erfolgt mit einem MALDI-Massenspektrometer Ultraflex TOF/TOF von der Firma Bruker Daltonics GmbH.

Alle eingesetzten Reagenzien werden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Hersteller und Reinheitsgrad werden in den entsprechenden Kapiteln der Experimentbeschreibung aufgeführt.

Zusammensetzung verwendeter Puffer in 1 l wässriger Lösung:

TBS

8,8 g NaCl

2,42 g Tris-HCl

CBS

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

2,1 g Zitronensäure

PBS

8,0 g Natriumchlorid

0,2 g Kaliumchlorid

1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat

0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat

Die Tween Puffer T-PBS bzw. T-TBS enthalten zusätzlich 0,05 % (v/v) Tween 20. Die Einstellung des pH-Wertes der Pufferlösungen erfolgt jeweils durch Zugabe von Salzsäure bzw. Natronlauge. Vor der Verwendung werden die Pufferlösungen autoklaviert. Eine Lagerung findet bei +4 °C statt.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften: Faden-Array

5.2.1 Lagerung

Faserproben werden grundsätzlich feucht und in PE-Folie eingeschweißt bei +4 °C gelagert.

5.2.2 Funktionalisierung und Immobilisierung

Bei großen Mengen von Fäden für spätere Bündelungen werden Reaktionsführung als auch Aufarbeitung auf einem Wipptisch in einer nach unten konisch zulaufenden PP-Schale (11 cm x 3 cm x 3 cm, 75 ml, Matrix autoclavable Reagent Reservoirs, Thermo Scientific) durchgeführt. Es wird jeweils ein Volumen von 40-50 ml Flüssigkeit verwendet. Die zu funktionalisierenden Fäden werden mäanderförmig zusammengelegt und an den Enden mit handelsüblichem, ungefärbtem Bindfaden verschnürt. Einzelne Fäden von geringer Menge werden hingegen in einem Glasgefäß mit Volumina von 5 ml ungeordnet schüttelnd behandelt.

a) Aminierung von Lyocellfäden

Vor der Funktionalisierung wird die Cellulose grundsätzlich in DMF gewaschen und anschließend ü. N. in 0,33 M CDI/DMF aktiviert. Es wird erneut in DMF gewaschen (3 x 3 min) und dann für mindestens 5 d in 1 M JA 500/DMF behandelt. Abschließend wird 4 x 3 min in dH₂O gewaschen.

b) Immobilisierung von Substanzen an aminierte Fäden

Vor einer Immobilisierung werden die initialfeuchten Fäden in DMF gewaschen. Für eine Biotinylierung wird eine frisch hergestellte Lösung aus Biotinamido-hexansäure-N-hydroxysuccinimidester in DMF (1 mg/ml) verwendet. Für einzelne lose Fäden werden 5 ml (11 µmol Biotin) Lösung eingesetzt, bzw. für große Mengen von Fäden 40 ml (88 µmol). Die Cellulose wird darin ü. N. geschwenkt und anschließend in DMF und dH₂O je 4 x 2 min gewaschen. Für eine Peptidkopplung wird eine frische Lösung Bromessigsäureanhydrid/DMF (0,5 M) hergestellt und die Cellulose darin 2,5 h behandelt. Anschließend wird in DMF und in dH₂O gewaschen. Das zu koppelnde thiolhaltige Peptid wird in MeCN/Wasser (1:1 v/v; 0,1 % TFA) gelöst und die Lösung mit gleichem Volumen an 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,0) so aufgefüllt, dass das Peptid in einer Endkonzentration von 0,29 mM vorliegt. Die bromacetylierten Fäden werden ü. N. in dieser Lösung geschwenkt. Die Lösung wird daraufhin abdekantiert und bei +4 °C aufbewahrt. Die Cellulose wird mit dH₂O gewaschen.

5.2.3 Quantifizierung per Bromphenolblau

Die zu untersuchenden Fäden werden in ein Glasgefäß mit 10 ml DMF gegeben. Nach Zugabe von 100 µl 1 % BPB/DMF ergibt sich eine grüngelbe Lösung, die Fäden werden blau gefärbt. Schlägt die Lösung ins Blaue um, wird bis zur Gelbfärbung schrittweise weitere BPB-Lösung gleichen Volumens hinzugegeben und mindestens 2 h geschüttelt. Am nächsten Tag wird in EtOH gewaschen und anschließend die Fäden ü. N. in 20 % Pip/DMF entfärbt. Eine Verdünnung von 1:10 oder 1:100 der tiefblauen Lösung wird photometrisch vermessen (605 nm, $\epsilon = 95000$) und daraus die Stoffmenge der Aminogruppen nach Gleichung 1 (Kap. 2.1.3.2) berechnet.

5.2.4 Bündelherstellung

Die Fäden werden einzeln mit einer Nadel durch die hexagonal angeordneten Löcher zweier paralleler Lochplatten gezogen. Der Plattenabstand beträgt 8 cm, der Lochabstand 3 mm bei einem Durchmesser von 1,5 mm. Jeder Faden wird am oberen Ende separat mit einer Klammer befestigt. Das untere Ende wird mit einem Gewicht (0,2 g Bleischrot) beschwert und taucht in ein mit dH₂O gefülltes Becherglas ein. Zur Verdrillung wird die untere Platte 15 mal um das Zentrum des Bündels gedreht, wobei die Cellulose mit Einbettmedium (Neg-50, Richard-Allan Scientific) versehen wird. Nach 0,5 h wird das leicht erstarrte Bündel von etwa 4-5 cm Länge beiderseits abgetrennt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dieses wird nun mit Medium aufgefüllt und nach stoßweisem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -20 °C gelagert.

5.2.5 Übertragung von Fadenquerschnitten auf Glasobjektträger

Die Probe wird mit NEG-50 Medium eingebettet und gefroren. Anschließend wird sie (Bündel oder lose Einzelfäden) im Kryostaten bei -16 °C geschnitten. Lose, ungeordnete Fäden werden mit einer Dicke von 5 µm ohne Vorzugsrichtung geschnitten, Fadenbündel zu 50 µm senkrecht zur Längsachse. Die Kryoschnitte werden sofort auf einen Glasobjektträger gleicher Temperatur aufgezogen und anschließend bei RT gelagert.

5.2.6 Durchführung biologischer Bindungstests auf Fadenquerschnitten

Für Proteinbindungstests werden die Querschnitte nach dem Schneiden auf funktionalisierte (NHS-Aktivester) Objektträger überführt. Die Glasträger werden grundsätzlich liegend behandelt und alle Lösungen werden sehr vorsichtig bis zur vollständigen Bedeckung auf den Träger pipettiert (1-3 ml) und nur langsam wieder

abgegossen. Mit Milli-Q Wasser wird das Einbettmedium zuerst angelöst (5-10 min) und anschließend 1 x kurz mit PBS (pH 7,0) gewaschen. Daraufhin werden die Objektträger für mindestens 1 h (meist 3 h) mit einem Blockierungs-Puffer behandelt. Dieser besteht entweder aus BSA/PBS (3 %) oder Milchpulver/PBS (4 %). Nach erneuten Waschschritten von 2 x 30 s mit PBS erfolgt die Inkubation mit einem Zielprotein: Eine Lösung von 2-10 µg/ml im jeweiligen Block-Puffer wird dazu mit einem Volumen von 1 ml auf den Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgt für mindestens 2 h in einer lichtdichten Feuchtigkeitskammer (µ-BOX, Quantifoil Instruments GmbH). Die eventuelle nachfolgende Inkubation mit einem fluoreszenzgelabelten Antikörper zur Markierung des Proteins wird nach Waschen (3 x 3 min T-TBS) für 1,5 h auf analoge Weise durchgeführt. Die eingesetzte Massenkonzentration des Antikörpers entspricht dabei der Hälfte der des Proteins in der Erstinkubation. Nach der letzten Inkubation werden die Glasträger 3 x 5 min mit T-TBS und anschließend 3 x 30 s mit Milli-Q Wasser gewaschen und im Dunkeln bei RT getrocknet.

5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften: Purinbibliothek

5.3.1 Vorbereitung der Celluloseträger

Für die *Einzelsynthese* wird ein Blatt APEG-Amino-Cellulose der Größe 8 cm x 12 cm in 96 gleichgroße (1 cm x 1 cm) Teile geschnitten. Jeder dieser Träger weist dann eine Mindeststoffmenge von 0,6 µmol an Fmoc geschützten Aminogruppen auf. Für die *Synthese nach SPOT-Bedingungen* werden sechs Blätter APEG-540 Fmoc-β-Ala-Cellulose der Größe 10 cm x 15 cm auf 9 cm x 13 cm zugeschnitten. Die Stoffmenge an Fmoc geschützten Aminogruppen beträgt 1,3-1,5 µmol pro 1 cm². Für die *Synthese nach der Cut & Combine Methode* wird ein Blatt APEG-Amino-Cellulose der Größe 7,2 cm x 11,25 cm verwendet. Mit Bleistift wird ein Raster eingezeichnet, welches aus Quadraten von 0,45 cm Kantenlänge und 0,20 cm² Fläche besteht. Jedes Quadrat weist damit etwa 0,12 µmol Fmoc geschützter Aminogruppen auf.

5.3.2 Lagerung

Die Lagerung von Cellulosemembranen findet trocken und eingeschweißt in PE-Folie bei -20 °C statt.

5.3.3 Allgemeine Reaktionsführung

Einzelnsynthese: Wird eine Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt, so werden die 1 cm² großen Celluloseträger in einem verschraubten Glasgefäß (Durchmesser: 2,5 cm, Höhe: 3 cm) von 10 ml Volumen mit dem entsprechenden Reaktionsgemisch geschwenkt. Das Volumen der Reaktionslösung beträgt in der Regel 25 µl.

Synthese nach SPOT-Bedingungen: Reaktionen bei Raumtemperatur, bei denen nicht der SPOT-Roboter eingesetzt wird, werden in einer PP-Schale mit den Maßen 16 cm x 5 cm x 11 cm (B x H x T) durchgeführt. Das Gefäß wird mit den Membranen und der Reaktionslösung langsam auf einem Duomat (Fa. Heidolph) geschwenkt.

Cut & Combine-Synthese: Für Reaktionen bei Raumtemperatur wird die Cellulose in PE-Folie mit Reaktionslösung versehen und eingeschweißt auf einem Duomat geschwenkt.

5.3.4 Spezielle Reaktionsführung in der Mikrowelle

Auf einer graphithaltigen Teflonplatte (Weflonplatte) liegend wird ein Celluloseträger von 1 cm² Fläche mit 25 µl Reaktionslösung versetzt und mit einer Glasplatte abgedeckt. Bei Verwendung größerer Membranflächen wird das Volumen an Lösung entsprechend angepasst. Über Mikrowellen-Absorption werden Reaktionsgemisch und Weflonplatte mit maximal 1200 W auf konstant zu haltende Zieltemperatur erhitzt. Bei einer Zieltemperatur von 150 °C beträgt die Aufheizzeit 1,5 min. Die erreichte Temperatur wird mit weniger als durchschnittlich 200 W Leistung gehalten. Sie wird über einen Faseroptiksensord innerhalb der Weflonplatte gemessen und geregelt. Wird eine Reaktion in mehreren sich wiederholenden Schritten durchgeführt, wird die Cellulose für jeden Schritt auf eine ungeheizte Weflonplatte überführt und erneut mit Reaktionslösung versetzt.

5.3.5 Aufarbeitung der Reaktionsansätze

Einzelnsynthese: Auf den Celluloseträger werden in einem 10 ml Glasgefäß 5 ml des angegebenen Lösemittels gegeben und dieses nach kurzem manuellem Schütteln verworfen. Mit jeweils 5 ml wird es einige Male für je 2 min auf einem Schüttler bewegt. Ist die Aufreinigung abgeschlossen, wird die feste Phase an der Luft getrocknet.

Synthese nach SPOT-Bedingungen: Auf die Cellulosemembranen werden in einem PP-Gefäß 50 ml des angegebenen Lösemittels gegeben und dieses nach kurzem Schwenken verworfen. Mit jeweils 50 ml wird es einige Male einige Minuten auf

einem Wipptisch bewegt. Ist die Aufreinigung abgeschlossen, wird die Membran mit einem Kaltluftfön getrocknet

Cut & Combine-Synthese: Blätter werden analog der Synthese nach SPOT-Bedingungen, jedoch mit Volumina von 25 ml, behandelt. Membranstreifen werden in einer nach unten konisch zulaufenden PP-Schale (11 cm x 3 cm x 3 cm) mit 25 ml Lösung geschwenkt, einzelne Schnipsel entsprechend den Einzelsynthesebedingungen.

5.3.6 Nachweis von Aminogruppen mit Bromphenolblau

Einzelsynthese: Die Reaktionslösung einer Fmoc-Aminosäure wird pro 1 cm² Celluloseträger mit 0,25 µl einer orangefarbenen Bromphenolblau-Stammlösung (1 % in DMF) versetzt, bevor jene auf den Träger pipettiert wird. Der Träger färbt sich je nach Konzentration anwesender Aminogruppen auf dem Celluloseträger grün bis blau. Bei Abwesenheit entsprechender Gruppen verbleibt der Träger ungefärbt.

Synthese nach SPOT-Bedingungen: Die Membranen werden in 50 ml einer Bromphenolblaulösung (0,01 % in DMF) geschwenkt, bis eine leichte Blaufärbung der Spots eintritt. Anschließend wird vier mal 2 min in EtOH gewaschen.

Cut & Combine-Synthese: Die Durchführung erfolgt analog der Einzelsynthesebedingungen.

5.3.7 Blockieren von nicht umgesetzten Aminogruppen

Einzelsynthese: Beim sogenannten „capping“ werden die Schnipsel zunächst kurz und anschließend 30-60 min bis zur Entfärbung in 5 ml 2% Ac₂O/DMF geschwenkt. Danach werden die Celluloseträger zunächst 5 mal mit DMF, dann 3 mal mit EtOH gewaschen.

Synthese nach SPOT-Bedingungen: Die Membranen werden gemeinsam in einem PP-Gefäß in 50 ml 2 % Ac₂O/DMF bewegt. Zunächst kurz und anschließend in erneut 50 ml Lösung für einige Minuten bzw. Stunden. Danach werden die Träger einige Male mit DMF, und einige Male mit EtOH gewaschen.

Cut & Combine-Synthese: Die Membranen werden gemeinsam zunächst kurz und anschließend für 30-60 min in 25 ml 2% Ac₂O/DMF geschwenkt. Danach werden die Celluloseträger mit DMF und EtOH gewaschen.

5.3.8 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Einzelsynthese: *n* Filter werden zu *n* ml 20% Piperidin/DMF (Abspalllösung) gegeben und 5 min lang geschwenkt. Für eine eventuelle Ausbeutebestimmung (Kap. 5.3.9)

wird die Abspalllösung aufbewahrt. Die Cellulose wird vier mal je 5 min in DMF und vier mal je 2 min in Ethanol gewaschen.

Synthese nach SPOT-Bedingungen: In einem PP-Gefäß werden die Membranen gleichzeitig in 50 ml 20 % Piperidin/DMF 5-10 min geschwenkt und anschließend fünf mal 5 min mit DMF gewaschen. Für eine eventuelle Ausbeutebestimmung (Kap. 5.3.9) wird die Abspalllösung aufbewahrt.

Cut & Combine-Synthese: Die jeweils mit der gleichen Aminosäure beladenen Celluloseträger werden gemeinsam in 20 ml Abspalllösung für 8 min geschwenkt und diese anschließend vermessen.

5.3.9 Ausbeutebestimmung über die Fmoc-Schutzgruppe

Die Abspalllösung wird 1:10 mit 20 % Pip/DMF verdünnt und bei einer Wellenlänge von 301 nm photometrisch vermessen. Daraus wird die Ausbeute des Produktes auf der Cellulose analog Gl. 2 (Kap. 2.1.3.2) berechnet. Die Beladung wird demnach in mol/cm² erhalten.

Gleichung 2:

$$n = \frac{VF \cdot Abs}{\varepsilon} \cdot \frac{V}{A}$$

Dabei gilt:

n = Stoffmenge [mol/cm²]

VF = Verdünnungsfaktor der Lösung

Abs = Absorption bei 301 nm

ε = Extinktionskoeffizient (7800 bei 301 nm)

V = Volumen der Abspalllösung [l]

A = Fläche der Membran [cm²]

5.3.10 Abspaltung des Produktes vom Träger

Einzelsynthese: Die abzuspal tenden, 1 cm² großen Träger werden über Nacht in je einem geöffneten Eppendorfgefäß in einen Exsikkator gestellt, welcher eine Abdampfschale mit 9 ml TFA und 1 ml DCM enthält. Am nächsten Tag wird die tiefrot verfärbte Cellulose gewaschen, indem 5 mal 300 µl Wasser/Acetonitril (1:1) auf je 1 cm² Träger gegeben werden. Es wird gründlich geschüttelt, die Waschlösung in ein neues Eppendorfgefäß (2 ml) überführt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge bis zur völligen Trockne eingengt. Der Rückstand (≈ 0,6 µmol) wird mit 50 µl DMSO aufgenommen, geschüttelt und zentrifugiert. Eine Lagerung findet bei –20 °C statt.

Synthese nach SPOT-Bedingungen: Die Kontrollspots werden mit einer Lochstanze aus der Membran ausgestanzt und in eine 96er Mikrotiterplatte (oder

Eppendorfggefäße) überführt. Sie werden geöffnet in einen Exsikkator gelegt, welcher eine Abdampfschale mit 200 ml (10 ml) 10 %DCM/TFA enthält. Am nächsten Tag wird die orange bis rot verfärbte Cellulose gewaschen, indem 3 x 30 µl (4 x 50 µl) Wasser/Acetonitril (1:1) auf je einen Kontrollspot gegeben werden. Jedes mal wird die Mikrotiterplatte 2 min in einem Ultraschallbad behandelt und die Waschlösungen werden anschließend nach und nach in eine zweite Mikrotiterplatte überführt und gesammelt. Eppendorfggefäße hingegen werden geschüttelt. Die Lösung wird in einer Vakuumzentrifuge bis zur völligen Trockne eingeengt, der Rückstand ($\approx 0,14 \mu\text{mol}$) mit 25 µl DMSO aufgenommen und 30 min geschüttelt. Eine Lagerung findet verschlossen bei -20°C statt.

Cut & Combine-Synthese: Die Abspaltung erfolgt entsprechend der Einzelsynthesebedingungen. Am nächsten Tag wird die tiefrot verfärbte Cellulose gewaschen, indem 4 mal 100 µl Wasser/Acetonitril (1:1) auf je $0,2 \text{ cm}^2$ Träger gegeben werden. Es wird gründlich geschüttelt, die Waschlösung in ein neues Eppendorfggefäß (1,5 ml) überführt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge bis zur völligen Trockne eingeengt. Der Rückstand ($\approx 0,1 \mu\text{mol}$) wird mit 40 µl DMSO aufgenommen, geschüttelt und zentrifugiert. Eine Lagerung findet bei -20°C statt.

5.3.11 Durchführung einer LC/MS Charakterisierung

Einzelsynthese: Von 50 µl der Lösung abgespaltenen Produktes werden zur Verdünnung 2 µl zu 18 µl DMSO gegeben. Injektionsvolumen sind i.d.R. 18 µl ($\approx 22 \text{ nmol}$) dieser Lösung.

Synthese nach SPOT-Bedingungen: Von 25 µl der Lösung abgespaltenen Kontrollproduktes werden 23 µl injiziert ($\approx 0,13 \mu\text{mol}$).

Cut & Combine-Synthese: Von 40 µl der Lösung abgespaltenen Kontrollproduktes werden 18 µl injiziert ($\approx 0,05 \mu\text{mol}$).

5.3.12 Auflösung von Cellulose nach dem SC²-Verfahren

Die quadratischen Schnipsel der Cut & Combine-Synthese werden mit einer Schere halbiert und je eine Hälfte in ein entsprechendes Röhrchen von 96er Racks der Firma Matrix gegeben. Der auf dem Boden der Röhrchen befindliche Barcode wird eingescannt und katalogisiert. Bei Synthesen auf wenigen einzelnen Spots oder Celluloseschnipseln hingegen werden Eppendorfggefäße verwendet. Zu jedem Träger werden 300 µl Auflösungsreagenz gegeben (im Falle von APEG-Amino-Cellulose: 88,5 % TFA, 2,5 % TIBS, 5 % H_2O , 4 % TFMSA bzw. für lösliche Cellulose: 82 % TFA, 10 %DCM, 3 % TIBS, 5 % H_2O). Nachdem ü. N. geschwenkt worden ist, werden je 500 µl MTBE hinzugegeben, 5 min geschwenkt und alles zur Fällung für

mindestens 20 min bei -20 °C kaltgestellt. Nach anschließender Zentrifugation (MTP: 3000 U/min, 10 min, IEC Centra GP8R; Eppendorfgefäße: 13500 rpm, 10 min, Eppendorf Tischzentrifuge) wird der Überstand abgenommen und verworfen. Der Rückstand wird dreimal gewaschen, indem 500 µl MTBE hinzugegeben werden und 5 min geschüttelt wird, und der Überstand nach 10 min Zentrifugation verworfen wird. Ist der rückständige Ether fast vollständig verdampft, werden je 500 µl DMSO hinzugegeben und die Röhrchen verschlossen. Nun wird ü. N. geschwenkt, wobei der Rückstand innerhalb einiger Minuten komplett in Lösung geht. Für eine Lagerung werden die erhaltenen Stammlösungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C oder -70 °C gelagert.

5.3.13 Spotten von Mikroarrays aus den Stammlösungen

Teilvolumina aller Stammlösungen werden in 96er MTP überführt und mit DMSO auf ein Zielvolumen von 80-100 µl verdünnt. Die erhaltenen Lösungen werden für mindestens 1 h geschwenkt, bevor daraus mehrere Mikroarrays gespottet werden. Jede Substanz wird dann an mehreren Stellen als Replikat auf dem jeweiligen Glasobjektträger aufgetragen. Entsprechendes gilt für die Kontrollen, die im Randbereich der zu testenden Sonden angebracht werden. Grundsätzlich verwendete Biotinkontrollen werden in einer Verdünnung 1:40 gegenüber der Stammlösung (1 Spot pro 0,5 ml DMSO) gespottet.

5.3.14 Proteinbindungstests auf gespotteten Mikroarrays

Die Glasträger werden schwenkend 3 min in Ethanol gewaschen und anschließend 3 x 3 min in TBS. Daraufhin werden sie für mindestens 1 h (meist ü. N.) mit einem Blockierungs-Puffer behandelt. Dieser besteht entweder aus BSA/PBS (3 %) oder Milchpulver/PBS (4 %). Nach einem erneuten Waschschrift von 3 min in T-TBS erfolgt die Inkubation mit einem ersten Protein: Eine Lösung von 5-10 µg/ml im jeweiligen Block-Puffer wird dazu mit einem Volumen von 60 µl auf den Objektträger gegeben und durch Auflegen eines Deckgläschens gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt. Die Inkubation erfolgt für mindestens 1,5 h (meist ≥3,5 h) in einer lichtdichten Feuchtigkeitskammer (µ-BOX, Quantifoil Instruments GmbH) bei einer vom Hersteller angegebenen Luftfeuchte von 100 %. Die eventuelle nachfolgende Inkubation mit einem fluoreszenzgelabelten Antikörper zur Markierung des Proteins wird nach Waschen (3 x 3 min T-TBS) für 1,5 h auf analoge Weise durchgeführt. Die Massenkonzentration des Antikörpers entspricht dabei der Hälfte der des Proteins in der Erstinkubation. Nach der letzten Inkubation werden die Glasträger 3 x 5 min mit T-TBS und anschließend 3 x 30 s mit Milli-Q Wasser gewaschen. Die im Argonstrom getrockneten Objektträger werden anschließend im Biochip-Reader eingescannt.

5.4 Spezielle Arbeitsvorschriften: Faden-Array

5.4.1 Untersuchung des Fadenmaterials

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um initialfeuchtes Fasermaterial.

5.4.1.1 Stabilität gegenüber Synthesereagenzien

Die Versuche werden durchgeführt an Lyocellfaser, ersponnen aus 8 %-iger Lösung von Cellulose. Je Versuchsansatz wird ein Fadenstück von 6 cm Länge untersucht. In einem Glasgefäß wird 5 ml des jeweiligen Lösemittels/Reagenzes dazugegeben. Getestet werden folgende Lösungen: DMF, DMSO, 20 % Pip/DMF, 2 % Ac_2O /DMF, DCM, 2 % Melm/DMF, Entschützungsreagenz (47,75 % TFA, 47,75 % DCM, 2,5 % TIBS, 2 % H_2O) Nach 7 d können Veränderungen am Faden nur im Falle des Entschützungsreagenzes festgestellt werden. Nach etwa 1 h fällt hier eine starke Quellung auf. Die Handhabung mit einer Pinzette führt zur Fragmentierung des Fadens. Über Nacht geht die Cellulose komplett in Lösung.

5.4.1.2 Aminierung und chemische Stabilisierung

Die Untersuchung erfolgt jeweils an einigen Zentimetern Lyocell. Getestet werden initialfeuchte Fäden, die aus einer Lösung von 8 % Cellulose ersponnen sind (Trockenmasse: 8 mg/m). Wird in einem Versuch eine Vorbehandlung in wässrigem Medium durchgeführt, wird nachfolgend mindestens 4 x 2 min mit Wasser gewaschen, nach Vorbehandlung in organischen Lösungen entsprechend mit DMF. Die Lyocellfäden werden grundsätzlich für die Funktionalisierung 5 x 3 min in DMF gewaschen und anschließend ü. N. in 0,33 M CDI/DMF aktiviert. Es wird erneut gewaschen (5 x 3 min in DMF) und dann in 1 M JA 500/DMF 1-16 d vergleichend behandelt. Als weitere Variation wird das Jeffamin 500 bei 5 d Reaktionszeit einmalig als 0,1 M Lösung eingesetzt. Abschließend wird 5 x 3 min in dH_2O gewaschen. Verschiedene Diamine werden als Aminierungsreagenzien (1 M) untersucht. Der Einfluss von Ultraschall wird getestet, indem das Reaktionsgefäß diesem 4 x täglich für je 20 min ausgesetzt wird. Verschiedene Vorbehandlungen der Fasern werden getestet. Durch Schütteln in 10 % Glycerol/Wasser (15 min) vor der Aminierung (anschließendes Waschen 3 x 2 min DMF) wird dessen Einfluss getestet. Analog wird mit 10 % TFA/DCM (20 min; waschen: 4 x 3 min DMF, 4 x 2 DCM) verfahren. Die Quantifizierung der gebildeten Aminogruppen auf dem Faden erfolgt über die Färbung mit BPB nach der allgemeinen Vorschrift (Kap. 5.2.3).

5.4.1.3 Einfluss verschiedener Additive auf die Fäden

Die Aminierungsausbeuten von Cellulosefäden mit verschiedenen Additiven werden getestet. Jeweils wird ü. N. in 0,33M CDI/DMF aktiviert und danach 5 d in 1 M JA 500/DMF aminiert. Zusätzlich wird die Kopplungseffizienz einer Biotinylierung bei den verschiedenen Fäden verglichen. Dazu werden jeweils entsprechend der Arbeitsvorschrift Streptavidinbindungstests durchgeführt, und örtliche Verteilung sowie Intensität der Fluoreszenz an den Fadenquerschnitten verglichen. Als Additive wurden je einer 7,5-10 %igen Cellusolösung folgende Substanzen zugesetzt: Borsäure (43 %), Stärke (30 % und 20 %), pyrogene Kieselsäure (30 % und 10 %, Degussa AG). Der prozentuale Anteil bezieht sich auf eine Monomereinheit der Cellulose. An $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ wird außerdem vor der Aminierung der Einfluss von 2,5 M NaOH/Wasser untersucht. 2 Meter Faden werden für 2 h in der wässrigen Lösung geschwenkt und anschließend gewaschen (6 x 2 min dH_2O , 4 x 2 min DMF). Die Cellulose wird aminiert und die erzeugten Aminogruppen quantifiziert.

5.4.1.4 Durchlässigkeit gegenüber kleinen Molekülen und Peptiden

Kovalent bindender Farbstoff: Zu 5 ml einer frisch hergestellten, Lösung aus FITC/DMF (30 mM) werden 200 μl (0,2 mmol) 1 M NaOH gegeben, wodurch sich unter leichter Erwärmung die Farbe von gelb in Richtung orange verändert. Bedeckt von der Lösung werden je einige Zentimeter aminierter und nicht aminierter Faden PurLyocell in Glasgefäßen für 2,5 h geschwenkt. Anschließend wird zunächst in DMF 3 x 2 min, 1 x ü. N. und erneut 2 x 2 min gewaschen und daraufhin 3 x 2 min in EtOH. Die getrockneten Fasern werden als Kryo-Schnitte auf Objektträger aufgezogen und per Fluoreszenzmikroskop untersucht. Alle den Fluorophor tragenden Substanzen werden lichtgeschützt gehandhabt.

Nicht-bindende Farbstoffe: Von Bromphenolblau und Kresolrot werden gesättigte Lösungen in Ethanol hergestellt. $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ als auch $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$ von einigen Zentimetern Länge werden je Farbstoff in je einem Eppendorfgefäß (2 ml) mit 1,6 ml der Lösung im Schüttelblock langsam geschüttelt. Dabei werden Reaktionszeiten von 1 h, 4 h und 24 h verglichen. Die 12 Proben werden 6 x 2 min in EtOH gewaschen bis die Waschlösung farblos bleibt und anschließend getrocknet. Nach dem Waschen behalten nur die funktionalisierten Fäden ihre Färbung. Die Lyocellproben werden als Kryo-Schnitte auf Objektträger aufgezogen und per Mikroskop verglichen.

Indirekt detektierbare Sonden: Die entsprechenden Sonden werden nach der allgemeinen Vorschrift an lose Fäden $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{NH}_2}$ von einigen Zentimetern Länge (0,3 $\mu\text{mol/m}$) gekoppelt (Kap. 5.2.2). Die Fäden werden geschnitten und auf Objektträger übertragen (Kap. 5.2.5). Nach einem anschließenden Bindungstest (Kap. 5.2.6) werden die Proben per Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Biotinylierte Fäden werden indirekt über einen Bindungstest mit dem fluoreszenzmarkierten (Cy3) Protein Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK) detektiert. Als Negativkontrolle werden außerdem nicht biotinylierte Fasern verwendet.

Ein Octapeptid (**1D3-Epitop**) wird nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.2.2*) an bromacetylierte Fäden gekoppelt. Verwendet werden dazu 3,5 ml einer 0,29 mM Reaktionslösung (1 μ mol) an einigen Zentimetern Faden (0,25 μ mol/m). Durch einen Bindungstest auf Glasobjektträgern wird die Sonde indirekt über einen entsprechenden 1D3-mAk aus der Maus (0,6 mg/ml) und einen fluoreszenzmarkierten (Cy3) Sekundärantikörper Anti-Maus aus der Ziege (Dianova, Hamburg) detektiert.

5.4.1.5 Einfluss der Funktionalisierung auf Fadendicke und Reißfestigkeit

Ein aminierte und ein unmodifizierter Faden werden verglichen. Nachdem eine der Proben aminierte ist, werden beide gewaschen und je auf Objektträger überführt. Für einen direkten Vergleich wird nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.2.4*) ein Bündel von 7 Fäden generiert, wobei 3 aminierte und 4 unmodifizierte Fäden verwendet werden.

5.4.1.6 Untersuchung der Porosität per TEM

Ein aminierte und ein unmodifiziertes Fadenstück von 2 cm Länge werden separat 3 x 2 min in MeOH gewaschen und methanolisch feucht gehalten. Es wird 75 h bei RT in 4 % Uranylacetat/MeOH inkubiert und 2 x 5 min in MeOH gewaschen. Anschließend erfolgt für 5 h eine Inkubation mit einer Monomerlösung/MeOH (1:2) gefolgt von 6 h in reinem Monomer (Epoxidharz). Nach einer Fixierung durch Polymerisation werden Ultradünnschnitte (90 nm Dicke) per Mikrotom angefertigt, und per TEM abgebildet. Eine Charakterisierung der Kontrastatome erfolgt per EELS (*electron energy loss spectroscopy*).

5.4.1.7 Versuche zur Direktsynthese am Lyocellträger

Direktsynthese eines Tripeptids an Lyocellfäden

Es werden Fadenproben mit 30 % (80 cm, 2,1 μ mol $-NH_2$) bzw. 10 % (147 cm, 0,37 μ mol $-NH_2$) SiO_2 -Anteil untersucht. Zu 10,6 mg (57,6 μ mol) Pentafluorophenol werden 415 μ l DMF gegeben. In der entstandenen Lösung werden 26,6 mg (49,3 μ mol) Fmoc-Rink Linker unter Vortexen aufgelöst und mit 9,2 μ l (59,4 μ mol) DIC für 30 min aktiviert. Die Lösung wird auf 10 ml mit DMF aufgefüllt und jeweils zu gleichen Teilen auf die zwei Fadenproben gegeben. Es werden je 50 μ l

0,1 % BPB/DMF dazugegeben, was zu einer intensiven Blaufärbung der Fasern und einer Gelbfärbung der Lösung führt. Die Proben werden ü. N. geschwenkt. Die schwach blaue Cellulose wird einem Capping unterzogen und nach dem Waschen mittels 1,5 ml 20 % Pip/DMF entschützt. Die Beladungsbestimmung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift über die Vermessung der Fmoc-Schutzgruppe. Für die anschließende Kopplung von Fmoc-Glycin werden je Probe 125 µl einer Lösung aus 0,2 M Fmoc-Gly in 0,35 M HOBt/NMP mit 5 µl DIC versetzt und 30 min aktiviert. Anschließend wird mit DMF auf 2 ml aufgefüllt und 20 µl 0,1 % BPB/DMF dazugegeben. Die Cellulose verfärbt sich tiefblau, während die Lösung schwach bläulich bzw. gelbgrün wird. Es wird ü. N. geschwenkt. Die nun entfärbten Fäden werden einem Capping von 30 min unterzogen und entschützt. Nach analoger Fmoc-Schutzgruppenstrategie wird das acetylierte Tripeptid K(Boc)Y(tBu)G generiert. Das Peptid wird abschließend analog einem Capping N-terminal acetyliert und nach Abspaltung entsprechend der allgemeinen Vorschrift für membranförmige Cellulose (Kap. 5.3.10) per LC/MS charakterisiert.

$R_t = 1,0$ min; ber. ($M+H^+$): 408,5 gef.: 408,9 (100), 431,1 (64), 447,1 (3), 391,2 (6)

Direktsynthese eines substituierten Purins an Lyocellfäden

Initialfeuchte Fäden von 317,9 mg werden zunächst analog der Direktsynthese eines Tripeptids mit Fmoc-Rink Linker und anschließend mit Fmoc-Prolin beladen. Die Fäden werden in DMF und in DMSO gewaschen und feucht auf einer Weflonplatte liegend mit 750 µl Reaktionslösung (2 M 2-Fluoro-6-chloropurin in 24 mM HOAc/DMSO) versehen und abgedeckt (vgl. Kap. 5.3.4). Die Reaktion wird bei 160 °C/15 min durchgeführt. Abspaltung und Charakterisierung per LC/MS verlaufen analog den Arbeitsvorschriften für planare Cellulose. 2-Fluoro-6-chloropurin wird von Good Luck Industry Co. Ltd., Nanjing, China erworben. Die Reinheit beträgt ≥ 97 % (HPLC).

$R_t = 3,1$ min; ber. ($M+H^+$): 251,2 gef.: 251,1 (92), 234,2 (50), 206,3 (100)

5.4.2 Faserbündel und Kryo-Schnitte

5.4.2.1 Haftung von Schnitten auf verschiedenen Glasobjektträgern

Ein Knäuel loser biotinhaltiger Fäden wird geschnitten und je mehrere Schnitte auf verschiedene Objektträger übertragen (Kap. 5.2.5). Auf jedem Träger wird ein Streptavidin-Cy3 Bindungstest durchgeführt (Kap. 5.2.6). Getestet werden Objektträger mit silanisierter Oberfläche (StarFrost[®] adhesive, Fa. Engelbrecht), und NHS-Aktivester haltiger Oberfläche (CodeLink[™] Activated Slides, Amersham

Biosciences), als auch Objektträger, die vor dem Auftragen der Schnitte mit einer dünnen Schicht kommerziellen Klebstoffes bestrichen werden. Per Fluoreszenzmikroskopie werden die Slides anschließend verglichen.

5.4.2.2 Einfluss der Schnittdicke auf die Fadenanordnung

Ein Bündel aus 7 Fäden $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$ und Kryo-Schnitte von 5 μm , 25 μm und 50 μm Dicke werden nach der allgemeinen Vorschrift hergestellt. Außerdem wird ein Bündel von 36 Fäden generiert und die Schnittdicken von 10, 16, 20, 30, 40 und 50 μm mikroskopisch verglichen.

5.4.2.3 Versuche zur Optimierung der Faseranordnung im 19er Bündel

An $\text{SiO}_2\text{Lyocell}^{\text{OH}}$ werden unterschiedliche Variationen bei den Herstellungsschritten von 19er Fadenbündeln durchgeführt. Es werden Einbettmedien mit Zusätzen von 10 % Wasser, 10 % Ethylenglycol (Smp.: -16 °C) oder mit erhöhter Temperatur getestet (vgl. Kap. 5.2.4). Für eine Erwärmung wird das Medium mindestens 0,5 h bei 45 °C in einem Trockenofen erhitzt. Als weiterer Versuch wird eine Lagerung des fixierten, nicht abgetrennten Bündels bei -70 °C getestet. Dazu wird das gesamte Stativ für 15 min in eine entsprechende Gefriertruhe überführt. Das Bündel wird in der Kälte mit einer Schere abgetrennt und in ein gekühltes Eppendorfgefäß gegeben. Das Gefäß wird zügig mit flüssigem (RT) Medium aufgefüllt und stoßweise durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren. Weiterhin wird hinsichtlich der Anordnung in den Lochplatten ein größerer Winkel der äußeren 12 Fäden zu untersucht. Dazu bleiben zwischen den inneren 7 Fasern und der äußeren Ebene von 12 Fasern zwei Reihen von Löchern unbesetzt. In diesem Versuch wird ebenfalls erwärmtes Medium verwendet und das Bündel vor der Abtrennung bei -70 °C gelagert.

5.4.3 **Proteinbindungstests an Fäden**

5.4.3.1 Sondendetektion an Faden-Arrays aus 7er Bündeln

Kleine organische Moleküle und Peptide werden je kovalent an Cellulosefäden gebunden (Kap. 5.2.2). Nach der allgemeinen Vorschrift werden Bündel aus 7 Fäden erzeugt (Kap. 5.2.4), wobei auf 3 dieser Fäden ein solches Sondenmolekül immobilisiert wurde. Dieses wird über einen Proteinbindungstest nachgewiesen (Kap. 5.2.5 & 5.2.6).

Für die Sonde Biotin wird als Zielprotein Streptavidin-Cy3 (2 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Jeder von 3 biotinylierten Fäden wird benachbart zu einem nicht biotinylierten Faden angeordnet. Es werden Kryo-Schnitte auf 2 Objektträger transferiert und

entsprechend der allgemeinen Vorschrift ein Bindungstest durchgeführt. Dabei wird ein Slide für 3 h mit 3 % Milchpulver/PBS geblockt, der andere Glasträger nur für 1 h. Die Ergebnisse werden unter dem Fluoreszenzmikroskop verglichen. Als weitere Visualisierungsmethode wird ein Mikroarray-Scanner (ArrayWorx Biochip Reader, Applied Precision) getestet.

Die 1D3-Peptidsonde wird von dem 1D3-mAk als Zielprotein erkannt. Durch einen Zweitantikörper gegen den 1D3-mAk wird die Sonde indirekt detektiert. Von den 3 eingesetzten peptidhaltigen Fasern werden 2 zueinander benachbart angebracht.

Es werden folgende Variationen der Versuchsbedingungen untersucht: Die Objektträger werden vor einem Bindungstest für 1,5 h auf 50 °C erhitzt und in dem Bindungstest bei höherem pH-Wert behandelt (PBS pH 8,0 bzw. 8,7).

5.4.3.2 Untersuchung der Homogenität eines Bündels

Ein 7er Bündel aus 4 biotinylierten und 3 aminierten Fäden wird hergestellt (Kap. 5.2.4). Das fixierte Bündel wird an 5 verschiedenen Stellen geschnitten. Je Stelle werden 4 Kryo-Schnitte durchgeführt und auf einem Glas Slide abgelegt. Die 5 Stellen besitzen je einen Abstand von 1000 µm, wobei der dazwischenliegende Teil verworfen wird. Nachdem die 5 Objektträger (je 4 Schnitte) für 2,5 h im Trockenofen (50 °C) gelagert worden sind, werden Streptavidin Bindungstests durchgeführt (Kap. 5.2.6). Die Proteinkonzentration beträgt 2 µg/ml, der pH-Wert wird bei 8,7 gepuffert. Ein Blocking wird für 3 h mit 4 % Milchpulver/PBS durchgeführt. Die Bildgebung erfolgt fluoreszenzmikroskopisch. Die erhaltenen Signale werden mittels Phoretix Array analysis software (Phoretix International, Newcastle, UK) quantifiziert. Je Slide wird die Intensität der biotintragenden Querschnitte ermittelt. Die mittlere Signalintensität aller Slides wird verglichen und grafisch dargestellt.

5.5 Spezielle Arbeitsvorschriften: Substanzbibliothek

5.5.1 Optimierte Einzelsynthese: 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin

5.5.1.1 Kopplung des Fmoc-Rink Linkers an Celluloseträger

Zu 248,64 mg (460,8 µmol) Fmoc geschütztem Rink Linker wird eine Lösung aus 101,76 mg (552,96 µmol) Pentafluorophenol in 4 ml DMF gegeben, anschließend geschüttelt und 30 min lang mit 88 µl (552,96 µmol) DIC aktiviert. Nach anschließender Zugabe von 40 µl 1 % BPB/DMF wird die Reaktionslösung zu 96 cm² (57,6 µmol Aminogruppen) Amino-Cellulose hinzugegeben, und über Nacht geschwenkt. Während sich die Cellulose hellblau färbt, ergibt sich für die Lösung

eine gelbe Farbe. Während der Reaktion nimmt die Färbung des Trägers bis zu einem hellen, schwachen Blau ab. Die Filter werden gecappt (Kap. 5.3.7) und anschließend 5 x 2 min in DMF und 3 x 2 min in Ethanol gewaschen. Bei den 96 Trägern wird die Schutzgruppe in 20 ml 20 % Piperidin/DMF abgespalten und die Konzentration der Beladung bestimmt.

5.5.1.2 Kopplung von Fmoc-Aminosäuren an Celluloseträger

Auf 1 cm² Träger (0,6 µmol Rink Linker) werden 25 µl (5 µmol) 0,2 M Lösung von Fmoc geschützter Aminosäure in 0,35 M HOBT/NMP gegeben und 1 µl (6,5 µmol) DIC zur Aktivierung (30 min) zugesetzt. Nach anschließendem Zusatz von 0,25 µl 1 % BPB-Lösung wird diese Flüssigkeit auf die Cellulose pipettiert und das Reaktionsgemisch ü. N. geschwenkt. Der Celluloseträger verfärbt sich blau, die Lösung gelb. Während der Reaktion nimmt die Färbung bis zu einem hellen, schwachen Blau ab. Die Filter werden gecappt und 5 x 2 min in DMF und 3 x 2 min in Ethanol gewaschen, woran sich eine Konzentrationsbestimmung der Beladung anschließt (Kap. 5.3.9).

5.5.1.3 Kopplung des Puringrundgerüsts an eine Aminosäure

Auf 1 cm² Träger (0,6 µmol Aminosäure) werden 25 µl einer gelben 2 M Lösung von 2-Fluoro-6-chloropurin (50 µmol) in 24 mM HOAc/DMSO (0,6 µmol) gegeben und für 15 min, 160 °C in der Mikrowelle erhitzt, wobei die Cellulose eine gelbliche Färbung annimmt. Die Filter werden gecappt (Kap. 5.3.7) und anschließend wird mehrfach je in DMF und Ethanol gewaschen und getrocknet.

2-Fluoro-6-phenylalaninylpurin, 2-Fluoro-6-prolinylpurin:

R_t = 6,0 min, ber. (M+H⁺): 301,3 gef.: 301,4 (24), 284,3 (8), 256,2 (100)

R_t = 2,9 min, ber. (M+H⁺): 251,2 gef.: 251,1 (100), 234,3 (65), 206,2 (97)

5.5.1.4 Derivatisierung der N-9 Position des Puringrundgerüsts

Auf 1 cm² Träger (0,6 µmol 2-Fluoro-6-prolinylpurin) werden 25 µl einer 2,2 M Lösung von Benzylbromid (55 µmol) in 40 mM DMAP/100 mM Bu₄NI/NMP (1 µmol bzw. 2,5 µmol) gegeben. Es wird für 15 min auf 160 °C in der Mikrowelle erhitzt. Die Prozedur wird 4 mal wiederholt und die Cellulose im Anschluss mehrmals je in DMF und Ethanol gewaschen und getrocknet. Die feste Phase hat sich zu Hellbraun verfärbt.

9-Benzyl-2-fluoro-6-prolinylpurin:

R_t = 9,0 min, ber. (M+H⁺): 341,3 gef.: 341,0 (100), 324,5 (73), 296,2 (95)

5.5.1.5 Derivatisierung der C-2 Position des Puringrundgerüsts

Auf einen Träger von 1 cm² (0,6 µmol 2-Fluoro-6-prolinyl-9-benzylpurin) werden 25 µl einer 4,6 M Lösung von Benzylamin (115 µmol) in 0,24 M DMAP/NMP (6 µmol) pipettiert und bei 170 °C für 30 min in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Prozedur 4 mal wiederholt worden ist, werden die Filter je einige male in DMF und Ethanol gewaschen. Die Färbung des Trägers hat sich in Richtung ockerfarben aufgehellt.

9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin, 2-Benzylamino-6-prolinylpurin
R_t = 9,2 min, ber. (M+H⁺): 427,5 gef.: 428,2 (100), 411,3 (3), 383,3 (8)
R_t = 5,5 min, ber. (M+H⁺): 338,4 gef.: 338,5 (100), 321,3 (8), 293,5 (12)

5.5.2 **Optimierung der Purinkopplung an ES.1**

Das Lösungsvolumen beträgt je 25 µl. Die Umsetzung wird durchgeführt als Reaktion ü. N. bei RT und für 12 min bei 150 °C in der Mikrowelle nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.4*), wobei Dioxan und DMSO als Lösemittel verglichen werden. In DMSO wird die Reaktion zusätzlich für 15 min bei 160 °C im durchgeführt. Außerdem wird unter Einsatz verschiedener Konzentrationen des Purins verglichen (0,2 M, 5 µmol; 0,4 M, 10 µmol; 2 M, 50 µmol). Die Lösung des Purins zeigt grundsätzlich eine gelbe Farbe.

2-Fluoro-6-phenylalaninylpurin, 2-Fluoro-6-prolinylpurin:
R_t = 6,0 min, ber. (M+H⁺): 301,3 gef.: 301,4 (32), 284,0 (4), 256,4 (100)
R_t = 2,9 min, ber. (M+H⁺): 251,2 gef.: 251,3 (100), 234,3 (32), 206,1 (100)

5.5.3 **Optimierung der Substitutionen an N-9 und C-2**

Grundsätzlich werden 25 µl der entsprechenden Reaktionslösung auf 1 cm² Celluloseträger pipettiert. Die Reaktionsführung folgt den allgemeinen Vorschriften (*Kap. 5.3.3 & 5.3.4*).

5.5.3.1 Substitution an N-9 vor C-2 mit Phe als Aminosäure

N-9 Benzylierung:

Bei 12 min und 150 °C in der Mikrowelle als auch ü. N. bei RT werden entsprechend *Tabelle 6 (Kap. 3.2.2.1)* die Lösemittel DMSO, NMP und DMF verglichen, in der Mikrowelle wird dabei der Einfluss von DIPEA, NaOH und CsCO₃ als Base untersucht. Benzylamin wird dabei in Konzentrationen von 0,4 M (10 µmol) bis 1,5 M (37,5 µmol) eingesetzt. Als Bromidaktivator wird Kaliumiodid (0,5 µmol) hinzugefügt.

9-Benzyl-2-fluoro-6-phenylalaninylpurin, 9-Benzyl-2-fluoro-6-(N-benzyl)phenylalaninylpurin:
R_t = 10,4 min, ber. (M+H⁺): 391,4 gef.: 391,5 (44), 374,2 (28), 346,4 (100)
R_t = 9,2 min, ber. (M+H⁺): 481,5 gef.: 481,3 (100), 464,4 (8), 436,6 (32)

C-2 Benzylaminierung:

Verschiedene Parameter der Reaktion werden entsprechend der *Tabelle 7 in Kapitel 3.2.2.2* variiert, wobei Benzylamin in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,5 M (12,5 µmol) und 4,6 M (115 µmol) eingesetzt wird. Als Lösemittel werden DMSO oder NMP verwendet. Die Reaktionen werden ü. N. bei RT und einige Minuten in der Mikrowelle getestet. Als Zusätze werden teilweise Tetrabutylammoniumtetrafluoroborat (0,6 µmol) und DIPEA (0,6 µmol) eingesetzt.

9-Benzyl-2-benzylamino-6-phenylalaninylpurin:
R_t = 10,8 min, ber. (M+H⁺): 478,6 gef.: 479,4 (100), 461,6 (66), 433,6 (20)
9-Benzyl-2-fluoro-6-phenylalaninylpurin:
R_t = 10,4 min, ber. (M+H⁺): 391,4 gef.: 391,2 (45), 374,1 (25), 346,4 (100)
2-Benzylamino-6-phenylalaninylpurin:
R_t = 7,0 min, ber. (M+H⁺): 388,4 gef.: 388,4 (100), 371,2 (60), 343,2 (40)
6-Phenylalaninylpurin:
R_t = 6,0 min, ber. (M+H⁺): 301,3 gef.: 301,5 (30), 284,2 (10), 256,4 (100)

5.5.3.2 Substitution an C-2 vor N-9 mit Phe als Aminosäure

C-2 Benzylaminierung:

Die Reaktion wird in der Mikrowelle mit 4,6 M Benzylamin (115 µmol) in einer Lösung 0,05 M DIPEA/NMP (1,2 µmol) durchgeführt. Bei 170 °C in der Mikrowelle werden folgende Reaktionszeiten getestet: 2 x, 3 x und 5 x 30 min.

2-Benzylamino-6-phenylalaninylpurin:
R_t = 6,9 min, ber. (M+H⁺): 388,4 gef.: 388,3 (98), 371,3 (100), 343,2 (68)

Für eine vorherige Substitution von Fluor gegen Iod wird Kaliumiodid bzw. Bu₄NI verwendet. 25 µl einer 0,05 M Lösung DIPEA/DMSO (1,2 µmol) werden auf den Träger pipettiert. Diese enthält 0,1 M (2,5 µmol) bzw. 0,5 M (12,5 µmol) des

entsprechenden Iodids. Die Reaktion wird je ü. N. bei RT, als auch 3 x 15 min bei 180 °C in der Mikrowelle durchgeführt.

N-9 Benzylierung:

Bei Konzentrationen von 30-50 mM Benzylbromid (0,75-1,25 µmol) in 24 mM KI/NMP (0,6 µmol) wird die Reaktion bei 12 min, 150 °C in der Mikrowelle, als auch für 3-5 d/40 °C verschlossen im Trockenschrank durchgeführt.

9-Benzyl-2-benzylamin-6-phenylalaninylpurin, Nebenprodukt:

R_t = 9,0 min, ber. (M+H⁺): 478,6 gef.: 478,5 (100), 461,5 (8), 433,5 (8)

R_t = 10,5 min, ber. (M+H⁺): 568,7 gef.: 568,5 (100)

Mitsunobu-Reaktion: Einem Celluloseträger von 1 cm² Fläche wird eine an Triphenylphosphan, DIAD und dem entsprechenden Alkohol äquimolare (1,66 mmol), frisch hergestellte Lösung in NMP oder THF (je über 3 Å Molsieb getrocknet) zugegeben. Dabei werden Volumina von 6 ml (0,28 M) und 1 ml (1,66 M) getestet, indem jeweils bei Raumtemperatur ü. N., bzw. für 2 d geschwenkt wird. Eine Reaktion im Mikrowellenofen wird bei 180 °C für 3 mal 15 min durchgeführt, für die 25 µl der je 1,66 M Lösung auf den Träger gegeben werden. Als Alkohole werden nacheinander Diphenylethanol, Benzylalkohol und Isopropanol eingesetzt.

2-Benzylamino-9-isopropyl-6-phenylalaninylpurin

R_t = 9,2 min, ber. (M+H⁺): 430,5 gef.: 430,4 (100), 413,4 (30)

5.5.3.3 Substitution an N-9 vor C-2 mit Pro als Aminosäure

N-9 Benzylierung:

Die Reaktion wird bei 160 °C für 5 x 15 min in der Mikrowelle durchgeführt. Das Benzylbromid wird als 2,2 M (55 µmol) Lösung in NMP eingesetzt, wobei DMAP (0,04 M, 1 µmol) hinzugegeben wird. Es werden verschiedene Konzentrationen von Iodid (24 mM, 0,6 µmol bzw. 100 mM, 2,5 µmol) untersucht. AlCl₃ x 6 H₂O wird in einer weiteren Reaktion 24 mM eingesetzt. Als Lösemittel werden in zwei Versuchen außerdem die ionischen Flüssigkeiten [BMIM]PF₆, bzw. BMIM]OAc, mit NMP als Lösemittel im Verhältnis 2:1 getestet.

C-2 Benzylaminierung:

Bei einer Reaktionsdauer von 5 x 30 min und 170 °C in NMP als Lösemittel wird der Einsatz von 0,05 M DIPEA (1,2 µmol) gegen 0,24 M DMAP (6 µmol) als Base untersucht.

5.5.4 Tests weiterer Substituenten

5.5.4.1 Tests verschiedener Aminosäuren für die Modellreaktion

10 sekundäre Aminosäuren (*Tabelle 8*) werden nach den Bedingungen in *Kapitel 5.5.1* & *Kapitel 3.1* getestet.

9-Benzyl-2-benzylamino-6-[**AS**]-purin:

[D-Tic]: $R_t = 7,3$ min, ber. ($M+H^+$): 490,6 gef.: 491,4 (100), 473,5 (10), 445,6 (20)

[Hyp]: $R_t = 8,4$ min, ber. ($M+H^+$): 444,5 gef.: 444,6 (100), 427,5 (2)

[Cptd]: $R_t = 11,3$ min, ber. ($M+H^+$): 602,7 gef.: 602,5 (100)

[Cmpi]: $R_t = 8,8$ min, ber. ($M+H^+$): 457,5 gef.: 457,3 (100)

[PipGly]: $R_t = 8,4$ min, ber. ($M+H^+$): 471,6 gef.: 471,7 (100), 454,6 (6)

[MeLeu]: $R_t = 11,8$ min, ber. ($M+H^+$): 458,6 gef.: 459,6 (100), 441,5 (27)

[MePhe]: $R_t = 11,6$ min, ber. ($M+H^+$): 492,6 gef.: 493,3 (100), 475,4 (23), 447,5 (9)

5.5.4.2 Tests verschiedener Halogenide für die Modellreaktion

Nach den Bedingungen in *Kapitel 5.5.1* & *Kapitel 3.1* werden 3-Chlorobenzylbromid, Iodheptan, Bromcyclohexan und 4-Chlorophenol getestet

2-Fluoro-9-heptyl-6-prolinylpurin, 2-Fluoro-9-(3-chloro-)benzyl-6-prolinylpurin:

$R_t = 11,6$ min, ber. ($M+H^+$): 349,4 gef.: 349,3 (100), 332,6 (36), 304,3 (55)

$R_t = 10,1$ min, ber. ($M+H^+$): 462,9 gef.: 462,5 (100), 417,3 (6)

5.5.4.3 Tests weiterer Amine für die Modellreaktion

Neben Benzylamin werden unter den optimierten Bedingungen als Amine 2,3-Dimethoxybenzylamin und 4-Chlorobenzylamin getestet. Die entsprechenden Produkte werden mit sehr guter Ausbeute erhalten.

9-Benzyl-2-(2,3-dimethoxy)-benzylamino-6-prolinylpurin:

$R_t = 9,3$ min, ber. ($M+H^+$): 488,6 gef.: 488,6 (100)

9-Benzyl-2-(4-chloro)-benzylamino-6-prolinylpurin:

$R_t = 10,1$ min, ber. ($M+H^+$): 462,9 gef.: 463,2 (100), 418,3 (4)

5.6 Versuch einer Bibliothekssynthese per SPOT-Methode

5.6.1 Vorbereitungen zur SPOT-Synthese

Vor dem ersten Cyclus werden die Membranen mit Bleistift von 1-6 nummeriert und eine Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.8*) wird durchgeführt. Anschließend werden 1:5 Verdünnungen der Abspalllösungen der Fmoc-Schutzgruppe photometrisch vermessen. Pro cm^2 ergeben sich Beladungen von 1,3 bis 1,5 μmol .

5.6.2 **Cyclus 0: Spotten von Raster und Kontrollspots**

Nachdem die Membranen 1-6 auf der Plattform des SPOT-Roboters passgenau positioniert sind, werden für das Spotten des Rasters 1,05 ml einer 0,3 M Lösung von Fmoc- β -AlaOPfp (0,32 mmol) in NMP bereitgestellt. Diese enthält 10,5 mg HOBt (77,7 μ mol), 52,5 μ l DIC (0,34 mmol) und 21 μ l BPB-Stammlösung (1 % in DMF). Für die Kopplung des Rink Linkers der Kontrollspots werden 1105 μ l einer Lösung von 0,11 M Rink Linker (122 μ mol) in DMF bereitgestellt. Diese enthält 2,41 mg Pfp (13,1 μ mol), 4 μ l DIC (25,8 μ mol) und 1 μ l BPB-Stammlösung (1 % in DMF). Die Lösung wird vor der Verwendung 30 min voraktiviert. Pro Membran wird jeder der 384 Bibliotheks-, bzw 16 Kontrollspots mit 0,1 μ l Lösung (30 nmol Fmoc- β -AlaOPfp bzw. 11 nmol Fmoc-Rink) mittels Stahlnadel auf den Träger gespottet. Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei RT werden die Membranen ü. N. gecappt und anschließend entschützt. Die Spots werden angefärbt (*Kap. 5.3.6*) und mindestens die Eck- und Kontrollspots mit Bleistift umrandet.

5.6.3 **Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren auf die Membranen**

Die Membranen 1-6 werden auf der Plattform des SPOT-Roboters passgenau positioniert. Auf jedes Blatt wird genau eine Fmoc geschützte Aminosäure gespottet, die als 0,2 M Lösung in NMP und 0,35 M HOBt vorliegt. Vor der Verwendung werden 100 μ l Lösung (20 μ mol AS) mit 4 μ l (25,8 μ mol) DIC mindestens 30 min lang voraktiviert. Pro Membran wird jeder der 384 Bibliotheks- und 16 Kontrollspots mit 0,2 μ l (40 nmol Fmoc-AS) Lösung aus einer Teflonnadel auf den Träger gespottet. Der gesamte SPOT-Cyclus wird dreimal mit Pausen von mindestens 30 min je SPOT wiederholt. Bei Reaktion ü. N./RT entfärben sich die Spots fast vollständig und die Träger *SP.1* werden anschließend 40 min gecappt, entschützt, angefärbt und aufgearbeitet.

5.6.4 **Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüsts auf SP.1**

Auf Membran 1 werden 2 ml einer 2 M Lösung von 2-Fluoro-6-chloropurin (4 mmol) in 24 mM (48 μ mol) HOAc/DMSO gleichmäßig verteilt. Bei 15 min, 160 °C in der Mikrowelle färben sich Teile der Cellulose ab etwa 5 min zunehmend braun und verkleben mit der Glasabdeckung, was zur Zerstörung der Membran führt. Membran 2 wird daraufhin für nur 6 min bei 160 °C behandelt, was jedoch ebenfalls zur Zerstörung führt. Beide Membranen werden über Cyclus 0 und 1 erneut hergestellt.

Alternativ wird die Reaktionslösung nun gespottet und für 4 min bei 160 °C behandelt. Der Vorgang wird bei Bedarf (Membran 1-3) bis zur Entfärbung der Spots ein- zweimal wiederholt, die Celluloseträger *SP.2* gecappt und gewaschen.

2-Fluoro-6-prolinylpurin:

$R_t = 6,2$ min, ber. ($M+H^+$): 251,2 gef.: 251,9 (94), 234,8 (50), 206,7 (100)

5.6.5 **Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüstes auf SP.2**

Der Cyclus wird für jede Membran separat durchgeführt und abgeschlossen. Die jeweilige Membran (*SP.2*) wird auf der Plattform des SPOT-Roboters passgenau positioniert. Auf die Spots gleicher Spalten der 6 Celluloseträger wird je das gleiche Benzylbromid aufgetragen. Die 24 verschiedenen Bromide werden unter Angabe der Spalten-Nummer in *Tabelle 10 (Kap. 3.3.5)* wiedergegeben. Gespottet werden je 0,2 µl einer 2,2 M Lösung des Bromids (0,44 µmol) in 0,04 M DMAP (8 nmol) und 0,01 M Bu₄Ni/NMP (2 nmol). Die Dauer beträgt etwa 30 min. Auf Grund geringerer Löslichkeit, werden 2,4-Dinitrobenzylbromid und 3-Bromomethylbenzonitril nur 1,5 M (0,3 µmol) eingesetzt, 2-Methoxy-5-nitrobenzylbromid und 4-Bromomethylbenzonitril nur 1,1 M (0,22 µmol). Nach dem Spotten erfolgt die Reaktion bei 15 min, 160 °C in der Mikrowelle. Der Vorgang wird (inkl. Spotten) 4 mal wiederholt, wobei sich in Spalte 12 (2-Nitrobenzylbromid) zunehmend eine dunkelbraune Färbung ergibt. Entsprechend wird bei den übrigen Membranen auf diese Substanz verzichtet und reines Lösemittel gespottet. Alle Spots weisen grundsätzlich eine schwache Braunfärbung auf.

Kontrollen: Auf die Kontrollspots (Spalte 25) wird auf jede Membran in den Zeilen 9-12 das 3-Chlorobenzylbromid, und in den Zeilen 13-16 Benzylbromid gekoppelt. Die übrigen Zeilen (1-8) gleichen sich jeweils auf Membran 1-2, 3-4 und 5-6 so, dass die 24 Substanzen hier fortlaufend in gleicher Reihenfolge wie beim Spotten der Bibliothek (Spalten 1-24) aufgetragen werden.

Charakterisierung: Von den Blättern 1-4 werden je zwei Kontrollen per LC/MS untersucht. Die Kontrollen sind je Blatt die Spots N25 bzw. I25, wobei Zeile N Benzylbromid bzw. Zeile I 3-Chlorobenzylbromid in Cyclus 3 entspricht.

Gezeigt ist pro Blatt je eine Kontrolle mit 1.) Benzylbromid und mit 2.) 3-Chlorobenzylbromid
Blatt 1 (AS: Cmpi):

1. -

2. $R_t = 7,8$ min, ber. ($M+H^+$): 404,8 gef.: 405,1 (100), 387,0 (2)

Blatt 2 (AS: MeLeu):

1. -

2. $R_t = 13,5$ min, ber. ($M+H^+$): 404,9 gef.: 406,2 (100), 389,0 (55), 361,1 (10)

Blatt 3 (AS: MePhe):

-

-

Blatt 4 (AS: Pro):

5.7 Bibliothekssynthese nach der Cut & Combine-Methode

5.7.1 Versuche zur Auflösung von APEG-Aminocellulose

Zu vier Schnipseln APEG-Aminocellulose von 0,125 cm² werden in einem Eppendorfgefäß (1,5 ml) je 300 µl einer der Auflösungsreagenzien I-IV (s. *Tabelle 11*, *Kap. 3.4.1*) gegeben und ü. N. geschwenkt. In allen Proben bildet sich eine Suspension und der Träger zerfällt nur teilweise. Die Gefäße werden 30 min im Ultraschallbad behandelt, wobei sich mit Auflösungsreagenz II eine komplett klare Lösung ergibt. In den Reagenzien I und IV ergeben sich nach 3 d schütteln Lösungen mit nur noch feinen Partikeln, während die Probe in Reagenz III als trübe Suspension verbleibt. Das Konjugat in Lösung II wird entsprechend der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.12*) gefällt und nach der Aufarbeitung in DMSO aufgelöst.

5.7.2 Einfluss des Auflösungsreagenzes auf ein trisubstituiertes Purin

Nach der Einzelsynthese von 9-Benzyl-2-benzylamino-6-prolinylpurin wird die Substanz abgespalten und letztlich als Lösung in 50 µl DMSO erhalten (*Kap. 5.3.10*). 30 µl werden abgenommen und zu 300 µl des TFMSA haltigen Auflösungsreagenzes gegeben. Die Lösung wird 24 h geschüttelt und 18 µl per LC/MS charakterisiert. Eine weitere Injektion erfolgt nach 7 d zusätzlichen Schüttelns.

5.7.3 Cyclus 0: Kopplung von Spacer und Linker

Auf eine Membran von 11,25 cm Länge und 7,2 cm Breite wird per Bleistift (HB) ein Raster von 25 x 16 Quadraten mit 0,45 cm Kantenlänge (0,2 cm²) gezeichnet. Jedes Quadrat wird mit einem Buchstaben (Zeile) und einer Zahl (Spalte) einseitig codiert. Die Kontrollspalte 25 (3,24 cm²) wird abgetrennt und mit Fmoc-Rink Linker analog *Kap. 5.5.1.1* beladen, auf die übrige Fläche (77,76 cm²) wird Fmoc-β-Ala entsprechend *Kap. 5.5.1.2* gekoppelt. Die Cellulose wird in passlich zugeschnittener PE-Folie mit der Lösung versehen und eingeschweißt. Von den nun blauen Membranen entfärbt sich ü. N. der Bibliotheksteil komplett, der Kontrollstreifen zu einem nur noch schwachen Blau. Nach einem Capping werden entsprechend der allgemeinen Vorschrift die Aminogruppen entschützt und die Beladungswerte bestimmt.

5.7.4 Cyclus 1: Kopplung von Aminosäuren an die Celluloseträger

Sowohl der Bibliotheksteil, als auch der Kontrollstreifen der Membran werden geviertelt (Bibliothek: A1-H12; A13-H24; I1-P12; I13-P24; Kontrollen: A-D; E-H; I-L;

M-P) und jeweils zusammen mit einer von vier sekundären Aminosäuren beladen (analog *Kap. 3.1.2*). Die Träger werden dazu in passlich zugeschnittener PE-Folie unter Blaufärbung mit der Lösung versehen, eingeschweißt und ü. N. auf einer Wippe bewegt. Während die Beladung mit Fmoc-Pro zu einer kompletten Entfärbung der Cellulose führt, zeigen die Fmoc-MeLeu und Fmoc-Tic Blätter noch eine leichte, die Fmoc-Cmpi Träger noch eine stärkere blaugrüne Färbung. Alle Träger werden gemeinsam bis zur vollständigen Entfärbung gecappt (40 min) und anschließend separat entschützt. Die Fmoc-Beladungswerte liegen zwischen $0,73 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (Tic) und $0,80 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (Prolin). Daraus ergibt sich pro Schnipsel *CnC.1* eine Aminogruppenbeladung von mindestens $0,15 \mu\text{mol}/0,2 \text{ cm}^2$.

5.7.5 **Cyclus 2: Kopplung des Puringrundgerüsts an CnC.1**

Es werden 4 Reaktionsdurchgänge durchgeführt, wobei jeweils die Träger mit der gleichen Aminosäure gemeinsam behandelt werden. Bei jedem Durchgang wird die Cellulose mit $510 \mu\text{l}$ einer 2 M Lösung von 2-Fluoro-6-chloropurin ($1,02 \text{ mM}$) in 24 mM HOAc/DMSO ($12,2 \mu\text{mol}$) versehen und bei 160°C für 5,5 min in der Mikrowelle behandelt. Abschließend werden die Träger *CnC.2* kurz in DMF gewaschen, gecappt und aufgearbeitet.

5.7.6 **Cyclus 3: Derivatisierung an N-9 des Puringrundgerüsts auf CnC.2**

Jeweils werden von jedem Viertel des Bibliotheksteils die ersten Spalten (A1-H1; I1-P1; A13-H13; I13-P13) gemeinsam mit dem gleichen Benzylbromid beladen. Entsprechend den 12 Spalten eines Viertels werden so 12 Reaktionsdurchgänge (12 verschiedene Bromide) durchgeführt. Kontrolle A wird mit Spalte 1, Kontrolle B, mit Spalte 2, usw. bis Kontrolle L mit Spalte 12 beladen. Die übrigen 4 Kontrollen M-P werden mit den gleichen Bromiden wie die Spalten 1,6,8 und 11 umgesetzt. Die 4 abgetrennten Spalten und 1-2 Kontrollschnipsel werden vor der Reaktion nun zusätzlich auf der noch unbeschriebenen Seite per Bleistift codiert und je Streifen mit $40 \mu\text{l}$ einer Lösung von 2,2 M[#] eines Benzylbromids ($88 \mu\text{mol}$) in 0,04 M DMAP und 0,01 M Bu₄Ni/NMP ($1,6 \mu\text{mol}$ bzw. $0,4 \mu\text{mol}$) versehen. Nach der Behandlung in der Mikrowelle (5 x 15 min, 160°C) und anschließendem Waschen werden mittelbraune Träger *CnC.3* erhalten.

[#]2-Methoxy-5-nitrobenzylbromid (Spalten 7+19, Kontrolle G) wird 1,1 M ($44 \mu\text{mol}$) eingesetzt und führt zu gelbfarbenen Trägern *CnC.3*.

5.7.7 Cyclus 4: Derivatisierung an C-2 des Puringrundgerüsts auf CnC.3

Für die Kopplung der 8 Amine werden immer 2 Zeilen (A+I, B+J, usw.) inkl. Kontrolle gemeinsam mit demselben Amin behandelt. Dazu werden die je 50 entsprechenden Quadrate von den Spalten aus Cyclus 3 abgetrennt und pro Schnipsel mit 5 µl einer 4,6 M[#] Lösung eines Amins (23 µmol) in 0,23 mM DMAP/NMP (1,2 nmol) versehen. Nach 5 x 30 min bei 170 °C in der Mikrowelle werden die nun leicht brüchigen Träger unter nur langsamem Schütteln 5 x 3 min in DMF und 3 x 3 min in EtOH gewaschen. Die Produkte werden auf grauweißen, bzw. A+I7 und A+I19 auf gelbfarbenen Trägern erhalten.

[#]Tyramin wird als 2 M Lösung (10 µmol) eingesetzt.

5.7.8 Charakterisierung der Reaktionskontrollen

Die 16 Kontrollsubstanzen werden nach der allgemeinen Vorschrift ü. N. vom Celluloseträger abgespalten und letztlich gelöst in 40 µl DMSO erhalten. Je 18 µl werden in die LC/MS injiziert.

- (A) R_t = 10,1 min, ber. (M+H⁺): 462,9 gef.: 462,9 (100); 446,1 (10), 418,0 (20)
- (B) R_t = 9,5 min, ber. (M+H⁺): 506,5 gef.: 507,0 (100), 462,3 (3)
- (C) R_t = 10,8 min, ber. (M+H⁺): 497,4 gef.: 496,9 (100), 480,1 (3), 454,0 (3)
- (D) R_t = 9,9 min, ber. (M+H⁺): 527,4 gef.: 527,3 (100), 481,9 (5)
- (E) R_t = 12,6 min, ber. (M+H⁺): 578,1 gef.: 578,3 (100)
- (F) R_t = 8,9 min, ber. (M+H⁺): 639,5 gef.: 639,2 (100)
- (G) R_t = 8,0 min, ber. (M+H⁺): 553,6 gef.: 554,4 (100)
- (H) R_t = 10,6 min, ber. (M+H⁺): 573,6 gef.: 574,3 (100)
- (I) R_t = 13,2 min, ber. (M+H⁺): 507,0 gef.: 508,2 (100), 490,3 (50), 462,2 (30)
- (J) R_t = 12,9 min, ber. (M+H⁺): 546,7 gef.: 548,1 (100), 530,2 (18), 502,3 (8)
- (K) R_t = 13,9 min, ber. (M+H⁺): 561,0 gef.: 562,1 (100), 544,3 (11), 516,1 (5)
- (L) R_t = 10,7 min, ber. (M+H⁺): 513,6 gef.: 515,3 (100), 497,3 (19), 469,2 (13)
- (M) R_t = 15,4 min, ber. (M+H⁺): 558,7 gef.: 559,1 (100)
- (N) R_t = 11,6 min, ber. (M+H⁺): 672,6 gef.: 672,0 (100), 627,2 (3)
- (O) R_t = 11,3 min, ber. (M+H⁺): 559,6 gef.: 560,3 (100), 515,3 (8)
- (P) R_t = 14,9 min, ber. (M+H⁺): 626,6 gef.: 628,3 (100), 582,4 (39)

5.8 Proteinbindungstests an der Purinbibliothek

5.8.1 Enzymatische Auflösung von Cellulose-Spots

Einfluss des Lösemittels: Zu 4 mit 1D3-Epitop beladenen Spots wird 1 U (0,11 mg) Cellulase (Cellulase aus *Trichoderma viride*, Sigma) in 500 µl Lösemittel gegeben. Als Lösemittel werden verglichen: Wasser (Milli-Q), Acetatpuffer (pH 5,0), TBS-Puffer (pH 6,5) und CBS-Puffer (pH 7,0). Als Negativkontrollen werden 4 weitere Spots in Lösemittel ohne Enzym behandelt. Die Proben werden in

Eppendorfgefäßen (2 ml) bei 30 °C geschüttelt und zuerst stundenweise, später tageweise hinsichtlich der Auflösung der Spots verglichen.

Einfluss der Behandlungsdauer: Zu je einem biotinhaltigen und einem mit Desthiobiotin beladenen Spot in einem Eppendorfgefäß (2 ml) werden 2 ml einer Lösung von 2 U/ml Cellulase in Wasser (Milli-Q) gegeben. Die Proben werden für 30 d bei 30 °C geschüttelt. An mehreren Tagen werden jeweils 50 µl Probenlösung abgenommen, für 60 min bei 70 °C im Ultraschallbad behandelt und nach kurzem Zentrifugieren bei -20 °C gelagert. Die so erhaltenen Lösungen von 20 verschiedenen Tagen[#] werden pro Substanz in eine Mikrotiterplatte überführt und 1:1 verdünnt (Milli-Q Wasser). Nach der allgemeinen Vorschrift werden die Proben auf Glas Slides gespottet (*Kap. 5.3.13*). Diese werden einem Streptavidin-Cy3 Bindungstest nach der allgemeinen Vorschrift (*Kap. 5.3.14*) unterzogen und anschließend eingescannt.

[#] Probennahme an Tagen: 1-4, 7-10, 14-18, 21-24, 28-30

5.8.2 Purvalanol B als Kontrollsonde

Analog einer Aminosäurekopplung (*Kap. 2.1.4.1*) wird PurB manuell an 4 Spots gekoppelt, von denen einer abschließend acetyliert wird. Ein nicht acetylierter Spot wird im Eppendorfgefäß (2 ml) in 1 ml einer Lösung von 6 U Cellulase/Wasser (Milli-Q) für 15 d bei 30 °C geschüttelt und anschließend für 75 min bei 80 °C im Ultraschallbad behandelt. Die feine Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die 3 übrigen Spots werden nach dem SC²-Verfahren aufgelöst (*Kap. 5.3.12*) und die erhaltenen 4 Stammlösungen in verschiedenen Verdünnungen (1:8, 1:5, 1:3) auf Glasobjektträger gespottet. Zusätzlich werden Stammlösungen von Biotinspots als Positiv- und β -Ala-Spots als Negativkontrollen gespottet (1:20 bzw. 1:5 verdünnt). Ein Proteinbindungstest nach der allgemeinen Vorschrift wird durchgeführt (*Kap. 5.3.14*). In der Erstinkubation wird ERK1-GST verwendet (10 µg/ml). Die Lösung der Zweitinkubation enthält Streptavidin-Cy3 und Anti-GST-Cy5 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien).

5.8.3 Herstellung von Purin-Mikroarrays auf Glas Slides

Nach der allgemeinen Vorschrift werden die 384 Positionsquadrate der Purinbibliothek in Stammlösungen zu je 500 µl überführt (*Kap. 5.3.12*). Je Substanz werden mit einem Pipettierroboter (SerialMate, Matrix) 20 µl der DMSO Stammlösungen in 96er Mikrotiterplatten überführt und mit DMSO auf 100 µl aufgefüllt. Die Lösungen werden für 2 h geschwenkt und die Bibliothek anschließend in Triplikaten auf Glasträger gespottet (Layout s. *Kap. 3.5.3*). Als Kontrollen dienen die auf gleiche Weise erhaltenen Stammlösungen von Biotin und Purvalanol B in den

Verdünnungen 1:40 bzw. 1:3. Nach dem Druck werden die Objektträger für 30 min bei 50 °C getrocknet und zur Lagerung in PE-Folie eingeschweißt.

5.8.4 Einfluss von Blockierungspuffern

Es werden Bindungstests mit ERK1-GST (10 µg/ml) auf den gespotteten Mikroarrays der Purinbibliothek durchgeführt. In einer Zweitinkubation werden Streptavidin-Cy3 und Anti-GST-Cy5 in halber Konzentration verwendet. Ein Kontroll-Slide wird ohne die Kinase analog behandelt. Als Kontrollen werden Biotin und PurB eingesetzt. Die Verwendung von BSA/PBS (3 %) und Milchpulver/PBS (4 %) als Blockierungsreagenzien wird verglichen. Die Blockierungsdauer beträgt je 12 h.

5.8.5 Bindungstests von Kinasen an der Purinbibliothek

Die Bindungstests werden mit GST-tag fusionierten Kinasen (10 µg/ml) durchgeführt, die teils kommerziell erhältlich sind (ERK1, p38α; Millipore, Billerica, USA bzw. Cell Signaling Technology, Danvers, USA) und teils aus Zellextrakten anderer Forschungsprojekte stammen (MAPK1, MAPK8, MAPK9, MAPK12, MAP2K4, MAP3K11, CDKN4, CDK5). Die Durchführung entspricht der allgemeinen Vorschrift, wobei das Blockieren mit BSA-Puffer ü. N. durchgeführt wird, bzw. bei p38α zum Vergleich auch mit Milchpulver. Die Enzyminkubation erfolgt für mind. 5 h (10 µg/ml), die Inkubation mit Anti-GST-Cy5 und Streptavidin-Cy3 für 1,5 h (je 5 µg/ml).

Die Docking-Berechnungen zwischen p38α und vier Purinliganden (Hit 1, Hit 2, Negativ 1, Negativ 2; s. *Abbildung 81*) aus der synthetisierten Bibliothek werden mit dem Programm GOLD (Version 4.1.2, cppbuild; aufgesetzt mit „Hermes“ Version 1.3.1) nacheinander durch Dr. Joachim Reichelt (Helmholtz-Zentrum f. Infektionsforschung, Braunschweig) vorgenommen. Als Basis dient die Kristallstruktur des Komplexes mit dem Code 2GTM aus der Protein Data Bank (www.pdb.org). Der Komplex beinhaltet die Verbindung von p38α mit einem Purininhibitor. Zentrum der Suche ist F27 LID, mit LID: 8-(2-Chlorophenylamino)-2-(2,6-difluorophenylamino)-9-ethyl-9H-purin-1,7-diium („PG-892579“). Jeweils werden 10 Docking-Läufe gerechnet (Parameter: defaults). Rechner: Intel® Core™2 Quad CPU Q6600, 2,4 GHz, 8 GB RAM.

6 Literaturverzeichnis

1. **Decker, J., Reischl, U.** *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases, Methods in Molecular Medicine*. Totowa, NJ : Humana Press Inc., 2004.
2. **Ulvik, A., Ueland, P.M.** Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in unprocessed whole blood and serum by real-time PCR: Application to SNPs affecting homocysteine and folate metabolism. *Clinical Chemistry*. 2001, 47, S. 2050.
3. **Shi, M.M.** Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clinical Chemistry*. 2001, 47, S. 164.
4. **Jannes, G., De Vos, D.** A Review of Current and Future Molecular Diagnostic Tests for Use in the Microbiology Laboratory. [Hrsg.] O'Connor. *Methods in Molecular Biology*. 2. Edition. Totowa, NJ : Humana Press Inc., 2004, Bd. 345: Diagnostic Bacteriology Protocols.
5. **Itoh, H., Miyajima, J., Umemura, S., Osamura, R.Y.** Lower HER-2/Chromosome Enumeration Probe 17 Ratio in Cytologic HER-2 fluorescence in situ hybridization for breast cancers: Three-dimensional analysis of intranuclear localization of centromere 17 and HER-2 signals. *Cancer Cytopathology*. 2008, 114, S. 134.
6. **Thiemann, F., Cullen, P.M., Klein, H.-G., [Hrsg.]**. *Leitfaden Molekulare Diagnostik*. Weinheim : Wiley-VCH, 2006. S. 82.
7. **Mims, C., Dockrell, H. M., Goering, R. V., Roitt, I., Wakelin, D., Zuckermann, M.** *Medizinische Mikrobiologie: Infektiologie*. 2. Edition. München : Elsevier GmbH, 2007.
8. **Stender, H.** PNA FISH: An intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2003, 3, S. 649.
9. **Mezzasoma, L., Bacarese-Hamilton, T., Di Cristina, M., Rossi, R., Bistoni, F., Crisanti, A.** Antigen microarrays for Serodiagnosis of infectious Diseases. *Clinical Chemistry*. 2002, 48, S. 121.
10. **Zhu, H., Biling, M., Bangham, R., et al.** Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*. 2001, 293, S. 2101.
11. **Vegas, A.J., Fuller, J.H., Koehler, A.N.** Small-molecule microarrays as tools in ligand discovery. *Chemical Society Reviews*. 2008, 37, S. 1385.
12. **Kuriyama, M., Wang, M.C., Papsidero, L.D.** Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Research*. 1980, 40, S. 4658.
13. **Townsend, M. B., Dawson, E. D., Mehlmann, M., Smagala, J. A., Dankbar, D. M., Moore, C. L., Smith, C. B., Cox, N. J., Kuchta, R. D., Rowlen, K. L.,** Experimental Evaluation of the FluChip Diagnostic Microarray for Influenza Virus Surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, 44, S. 2863.
14. **Laboratories, Bühlmann.** Amanitin-ELISA, instruction manual. *Bühlmann Laboratories*. 2000.

15. **Egerer, K., Feist, E., Burmester, G.-R.** Serologische Diagnostik der rheumatoiden Arthritis: Antikörper gegen citrullinierte Antigene. *Deutsches Ärzteblatt*. 2009, 106, S. 159.
16. **Doig, A.R.** Molecular Diagnostics Market Assessment. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 2007, 27.
17. **Duburcq, X., Olivier, C., Malingue, F., Desmet, R., Bouzidi, A., Zhou, F., Auriault, C., Gras-Masse, H., Melnyk, O.** Peptide-Protein Microarrays for the Simultaneous Detection of Pathogen Infections. *Bioconjugate Chemistry*. 2004, 15, S. 307.
18. **Kricka, L. J.** Trends in Immunoassay Technologies. *Journal of Clinical Immunoassay*. 1993, 16, S. 267.
19. **Wölfl, S.** BioChip-Technologien. *Transkript Laborwelt*. 2000, 3, S. 12.
20. **Xu, Q., Lam, K.** Protein and Chemical Microarrays - Powerful Tools for Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2003, 5, S. 257.
21. **Augenlicht, L. H., Wahrman, M. Z., Anderson, L., Taylor, J., Lipkin, M.** Expression of Cloned Sequences in Biopsies of Human Colonic Tissue and in Colonic Carcinoma Cells Induced to Differentiate in Vitro. *Cancer Research*. 1987, 47, S. 6017.
22. **Southern, E.M., Maskos, U.** Substrat-gebundene Oligonukleotide. EP 0 386 229 B2 Großbritannien, 21. 09 1988.
23. **Fodor S., Read, J., Pirrung, M., Stryer, L., Tsai Lu, A., Solas, D.** Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 1991, 251, S. 767.
24. **Fodor, S., Rava, R., Huang, X., Pease, A., Holmes, C., Adams, C.** Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*. 1993, 364, S. 555.
25. **Venkatasubbarao, S.** Microarrays - status and prospects. *Trends in Biotechnology*. 2004, 22, S. 630.
26. **Singh-Gasson, S., Green, R., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M., Cerrina, F.** Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nature Biotechnology*. 1999, 17, S. 974.
27. **Michael, K.L., Taylor, L.C., Schultz, S.L., Walt, D.R.** Randomly Ordered Addressable High-Density Optical Sensor Arrays. *Analytical Chemistry*. 1998, 70, S. 1242.
28. **Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O.** Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 1995, 270, S. 467.
29. **MacBeath, G., Koehler, A., Schreiber, S.L.** Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, 121, S. 7967.
30. **Petrik, J.** Diagnostic applications of microarrays. *Transfusion Medicine*. 2006, 16, S. 233.
31. **MacBeath, G., Schreiber, S.L.** Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*. 2000, 289, S. 1760.

32. **Pawletz, C.P., Charboneau, L., Bichsel, V.E., Simone, N.L., Chen, T., Gillespie, J.W., Emmert-Buck, M.R.,(...), Liotta, L.A.** Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene*. 2001, 20, S. 1981.
33. **Charboneau, L., Scott, H., Chen, T., Winters, M., Petricoin 3rd., E.F., Liotta, L.A., Pawletz, C.P.** Utility of reverse phase protein arrays: applications to signalling pathways and human body arrays. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2002, 1, S. 305.
34. **He, M., Taussig, M.J.** Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method). *Nucleic acids research*. 2001, 29, S. E73.
35. —. DiscernArray™ technology: A cell-free method for the generation of protein arrays from PCR DNA. *Journal of Immunological Methods*. 2003, 274, S. 265.
36. **Thiele, A.** Peptide Microarrays for Determination of Cross-Reactivity. [Hrsg.] U., Schutkowski, M. Reineke. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ : Humana Press Inc., 2009, Bd. 524: Epitope Mapping Protocols, S. 225.
37. **Pellois, J.P., Zhou, X., Srivannavit, O., Zhou, T., Gulari, E., Gao, X.** Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips. *Nature Biotechnology*. 2002, 20, S. 922.
38. **Reimer, U., Reineke, U., Schneider-Mergener, J.** Peptide arrays: From macro to micro. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, 13, S. 315.
39. **Frank, R.** Spot-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*. 1992, 48, S. 9217.
40. **Dikmans, A., Beutling, U., Schmeisser, E., Thiele, S., Frank, R.** SC²: A Novel Process for Manufacturing Multipurpose High-Density Chemical Microarrays. *QSAR and Combinatorial Science*. 2006, 25, S. 1069.
41. **Beyer, M., Nesterov, A., Block, I., König, K., Felgenhauer, T., Fernandez, S., Leibe, K., Torralb, G., Hausmann, M., Trunk, U., Lindenstruth, V., Bischoff, F.R., Stadler, V., Breitling, F.** Combinatorial Synthesis of Peptide Arrays onto a Microchip. *Science*. 2007, 318, S. 1888.
42. **Kumaresan, P.R., Lam, K.S.** Screening chemical microarrays: methods and applications. *Molecular BioSystems*. 2006, 2, S. 259.
43. **Stockwell, B.R., Haggarty, S.J., Schreiber, S.L.** High-throughput screening of small molecules in miniaturized mammalian cell-based assays involving post-translational modifications. *Chemistry & Biology*. 1999, 6, S. 71.
44. **Falsey, J.R., Renil, M., Park, S., Li, S., Lam, K.S.** Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chemistry*. 2001, 12, S. 346.
45. **Fazio, F., Bryan, M.C., Blixt, O., Paulson, J.C., Wong, C.-H.** Synthesis of sugar arrays in microtiter plate. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, 124, S. 14397.

46. **Childs-Disney, L.L., Wu, M., Pushechnikov, A., Aminova, O., Disney, M.D.** A small molecule microarray platform to select RNA internal loop - Ligand interactions. *ACS Chemical Biology*. 2007, 2, S. 745.
47. **Vegas, A.J., Bradner, J.E., Tang, W., McPherson, O.M., Greenberg, E.F., Koehler, A.N., Schreiber, S.L.** Fluorous-Based Small-Molecule Microarrays for the Discovery of Histone Deacetylase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, 46, S. 7960.
48. **Ko, K.S., Jaipuri, F.A., Pohl, N.L.** Fluorous-Based Carbohydrate Microarrays. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, 127, S. 13162.
49. **Nicholson, R.L., Ladlow, M.L., Spring, D.R.** Fluorous tagged small molecule microarrays. *Chemical communications*. 2007, 38, S. 3906.
50. **Balkenhohl, F., v.d. Bussche-Hünnefeld, C., Lansky, A., Zechel, C.** Kombinatorische Synthese niedermolekularer organischer Verbindungen. *Angewandte Chemie*. 1996, 108, S. 2436.
51. **Merrifield, R.B.** Solid Phase Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1963, 85, S. 2149.
52. **Frank, R., Döring, R.** Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports. *Tetrahedron*. 1988, 44, S. 6031.
53. **Houghten, R.A.** General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985, 82, S. 5131.
54. **Dittrich, F., Tegge, W., Frank, R.** 'Cut and combine': An easy membrane-supported combinatorial synthesis technique. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1998, 8, S. 2351.
55. **Furka, A., Sebestyen, F., Asgedom, M., Dibo, G.** General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1991, 37, S. 487.
56. **Lam, K.S., Lebl, M., Krchnak, V.** The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method. *Chemical Reviews*. 1997, 97, S. 411.
57. **Ohlmeyer, M.H.J., Swanson, R.N., Dillard, L.W., Reader, J.C., Asouline, G., Kobayashi, R., Wigler, M., Still, W.C.** Complex synthetic chemical libraries indexed with molecular tags. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993, 90, S. 10922.
58. **Brenner, S., Lerner, R.A.** Encoded combinatorial chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992, 89, S. 5381.
59. **Geysen, H.M., Meloen, R.H., Barteling, S.J.** Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984, 81, S. 3998.

60. **Blackwell, H.E.** Hitting the SPOT: small-molecule macroarrays advance combinatorial synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006, 10, S. 203.
61. **Scharn, D., Wenschuh, H., Reineke, U., Schneider-Mergener, J., Germeroth, L.** Spatially Addressed Synthesis of Amino- and Amino-Oxy-Substituted 1,3,5-Triazine Arrays on Polymeric Membranes. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2000, 2, S. 361.
62. **Li, X., Quigg, R. J., Zhou, J., Gu, W., Rao, P. N., Reed, E. F.** Clinical Utility of Microarrays: Current Status, Existing Challenges and Future Outlook. *Current Genomics*. 2008, 9, S. 466.
63. **de Leon, J., Susce, M.T., Murray-Carmichael, E.** The AmpliChip™ CYP450 genotyping test: Integrating a new clinical tool. *Molecular Diagnosis and Therapy*. 2006, 10, S. 135.
64. **Glas, A. M., Floore, A., Delahaye, L., Witteveen, A. T., Pover, R., Bakx, N., Lahti-Domenici, J., Bruinsma, T. J., Warmoes, M. O., Bernards, R., Wessels, L., Van 't Veer, L. J.** Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*. 2006, 7, S. 278.
65. **Lu, D., Chen, S., Zhan, S., Zhang, M., Zhang, W., Bo, X., Wang, S.** Screening of specific antigens for SARS clinical diagnosis using a protein microarray. *Analyst*. 2005, 130, S. 474.
66. **Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A.C., Szallasi, Z.** Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends in Genetics*. 2006, 22, S. 101.
67. **Choudhuri, S.** Microarrays in Biology and Medicine. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2004, 18, S. 171.
68. **Weeraratna, A.T., Nagel, J.E., De Mello-Coelho, V., Taub, D.D.** Gene Expression Profiling: From Microarrays to Medicine. *Journal of Clinical Immunology*. 2004, 24, S. 213.
69. **Seidel, M., Niessner, R.** Automated analytical microarrays: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 391, S. 1521.
70. **Petricoin III, E.F., Hackett, J.L., Lesko, L.J., Puri, R.K., Gutmann, S.I., Chumakov, K., Woodcock, J., Feigal, D.W., Kathryn, C.Z., Sistare, F.D.** Medical applications of microarray technologies: A regulatory science perspective. *Nature Genetics*. 2002, 32, S. 474.
71. **Frank, R.** Method for producing a plurality of identical copies of a two-dimensional test array of probe molecules. WO 02/082080 A2 International, 17. 10 2002.
72. **Sumi, Fukuda, Hiromoto, Ikeda.** Faseranordnungsvorrichtung und Verfahren zur Faseranordnung unter Verwendung der Vorrichtung, Faseranordnungswerkzeug, Verfahren zur Herstellung eines Körpers mit angeordneten Fasern und... EP1627839 27.04.2006 Europa, 27. 04 2006.
73. **Han, F.C., Li, X.J., Jiang, H., Qin, L.P., Li, D., Guo, Y.H., Liu, Z.G., Zhang, L., Yan, X.J.** Detection of H pylori antibody profile in serum by protein array. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, 12, S. 4044.

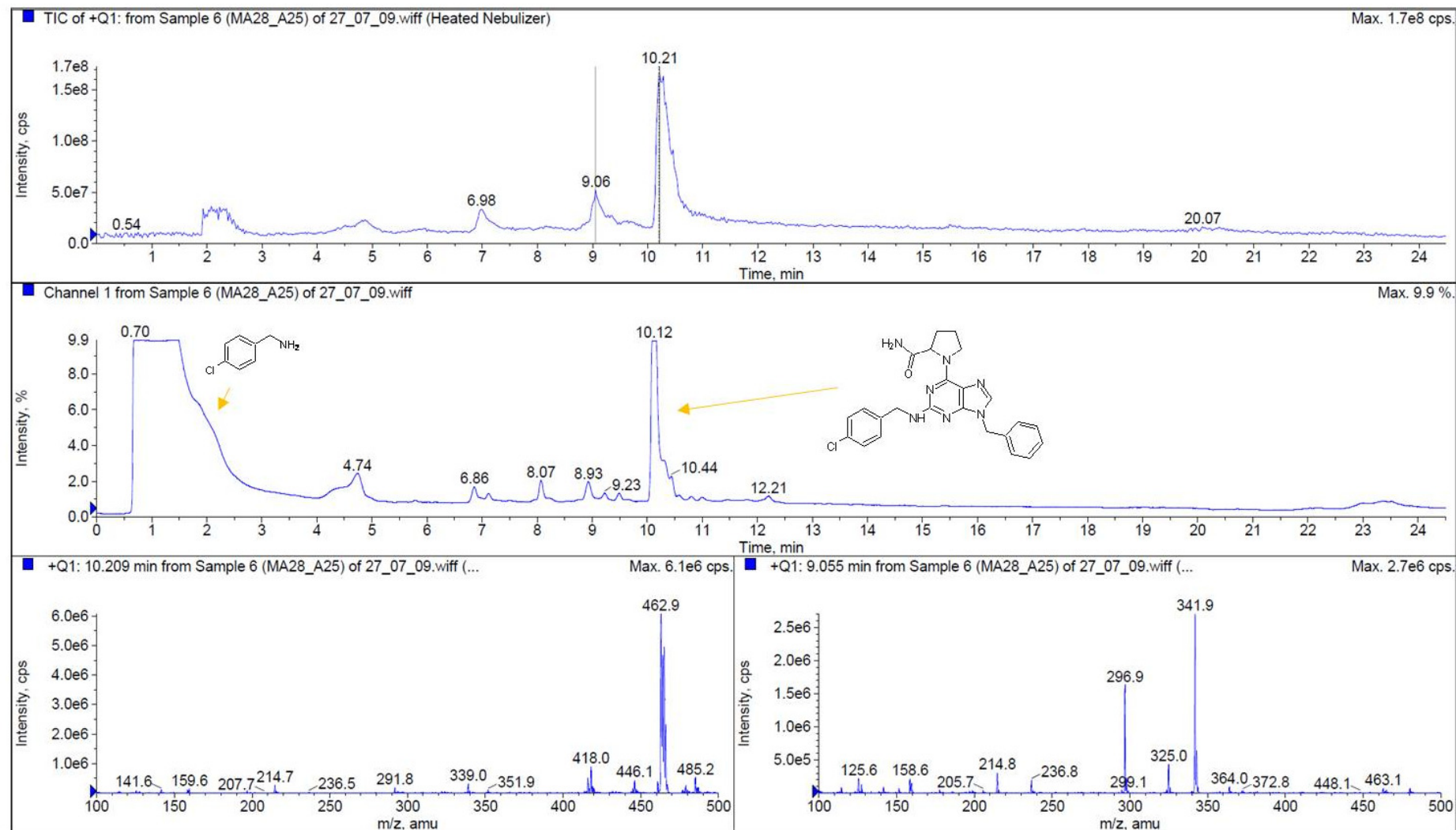
74. Thieme Römpf Online. [Online] Georg Thieme Verlag, 04. 01 2010. <http://www.roempf.com>.
75. **Cibik, T.** Untersuchungen am System NMMO/H₂O/Cellulose. *Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin*. 2003.
76. **Abu-Rous, M., Varga, K., Bechtold, T., Schuster, K.C.** A New Method to Visualize and Characterize the Pore Structure of TENCEL(R) (Lyocell) and Other Man-Made Cellulosic Fibres Using a Fluorescent Dye Molecular Probe. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007, 106, S. 2083.
77. **Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A.** Cellulose: faszinierendes Biopolymer und nachhaltiger Rohstoff. *Angewandte Chemie*. 2005, 117, S. 3422.
78. **Asseline, U., Thuong, N.T.** New solid-phase for automated synthesis of oligonucleotides containing an amino-alkyl linker at their 3'-end. *Tetrahedron Letters*. 1990, 31, S. 81.
79. **Alila, S., Ferraria, A.M., do Rego, A.M.B., Boufi, S.** Controlled surface modification of cellulose fibers by amino derivatives using N,N'-carbonyldiimidazole as activator. *Carbohydrate Polymers*. 2009, 77, S. 553.
80. **Krchnak, V., Vagner, J., Safar, P., Lebl, M.** Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid – base indicator. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1988, 53, S. 2542.
81. **Tomljenovic, A., Cunko, R.** Einfluss des Ultraschalls auf das Sorptionsvermögen von Zellulosefasern. *Tekstil*. 2003, 52, S. 253.
82. **Kulshreshtha, A.K., Patel, A.R., Baddi, N.T., Srivastava, H.C.** Studies on never-dried cotton. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*. 1977, 15, S. 165.
83. **Öztürk, B.H., Potthast, A., Rosenau, T., Abu-Rous, M., MacNaughtan, B., Schuster, K.C., Mitchell, J.R., Bechtold, T.** Changes in the intra- and inter-fibrillar structure of lyocell TENCEL fibers caused by NaOH treatment. *Cellulose*. 2009, 16, S. 37.
84. **Frank, R., Hoffman, S., Overwin, H., Behn, C., Gausepohl, H.** Easy Preparation of Synthetic Peptide Repertoires for Immunological Studies Utilizing SPOT Synthesis. [Hrsg.] C.H. Schneider. *Peptides in Immunology*. s.l. : John Wiley & Sons, Ltd., 1996, S. 196.
85. **Lünsdorf, H., Strömpl, C., Osborn, A.M., Bennasar, A., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Timmis, K.N.** Approach to Analyze Interactions of Microorganisms, Hydrophobic Substrates, and Soil Colloids Leading to Formation of Composite Biofilms, and to Study Initial Events in Microbiogeological Processes. *Methods in Enzymology*. 2001, 336, S. 317.
86. **Hausner-Haddouch, C.** Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die intrazelluläre Calciumlokalisierung bei *Vorticella spec.* (Linné). *Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum*. 1999.

87. **Carpino, L.A., Han, G.Y.** The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *Journal of Organic Chemistry*. 1972, 37, S. 3404.
88. **Rink, H.** Solid-Phase synthesis of protected peptide fragments using a Trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters*. 1987, 28, S. 3787.
89. **Hernán.** *Methodenentwicklungen zur Festphasensynthese. Parallelsynthese neuer Naturstoff-Hybride, -Derivate und -Makrozyklisierungsprodukte über chemische Marker Strategien*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena : s.n., 2003.
90. **Krchňák, V., Szabo, L., Vágner, J.** A solid phase traceless synthesis of quinoxalinones. *Tetrahedron Letters*. 2000, 41, S. 2835.
91. **Legraverend, M., Grierson, D.S.** The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006, 14, S. 3987.
92. **Laufer, S.A., Domeyer, D.M., Scior, T.R.F., Albrecht, W., Hauser, D.R.J.** Synthesis and Biological Testing of Purine Derivatives as Potential ATP-Competitive Kinase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005, 48, S. 710.
93. **Ten Berge, R.J.M., Schellekens, P.T.A., Surachno, S., The, T.H., Ten Veen, J.A., Wilmink, J.M.** The influence of therapy with azathioprine and prednisone on the immune system of kidney transplant recipients. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1981, 21, S. 20.
94. **Wissing, J., Jansch, L., Nimtz, M., Dieterich, G., Hornberger, R., György, K., Wehland, J. and Daub, H.** Proteomics Analysis of Protein Kinases by Target Class-selective Prefractionation and Tandem Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007, 6.3, S. 537.
95. **Altmann, K.-H., Mutter, M.** Die chemische Synthese von Peptiden und proteinen. *Chemie in unserer Zeit*. 1993, 6, S. 274.
96. **Schow, S.R., Mackman, R.L., Blum, C.L., Brooks, E., Horsma, A.G., Joly, A., Kerwar, S.S., (...), Lum, R.T.** Synthesis and activity of 2,6,9-trisubstituted purines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 1997, 7, S. 2697.
97. **Austin, R.E., Waldraff, C., Al-Obeidi, F.** Microwave assisted solid-phase synthesis of trisubstituted 2-(2,6-purin-9-yl)acetamides. *Tetrahedron Letters*. 2005, 46, S. 2873.
98. **Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J.** The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1986, 27, S. 279.
99. **Giguere, R.J., Bray, T.L., Duncan, S.M., Majetich, G.** Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1986, 27, S. 4945.
100. **Kappe, C.O.** Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2004, 43, S. 6250.
101. **Lin, Q., O'Neill, J.C., Blackwell, H.E.** Small molecule macroarray construction via Ugi four-component reactions. *Organic Letters*. 2005, 7, S. 4455.

102. **He, H., Hong, L., Kaixian, C., Hualiang, J.** Microwave-assisted rapid synthesis of 2,6,9-substituted purines. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2007, 9, S. 197.
103. **Takvorian, A.G., Combs, A.P.** Microwave-assisted organic synthesis using minivials to optimize and expedite the synthesis of diverse purine libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2003, 6, S. 171.
104. **Tunçbilek, M., Ateş-Alagöz, Z., Altanlar, N., Karayel, A., Özbey, S.** Synthesis and antimicrobial evaluation of some new substituted purine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2009, 17, S. 1693.
105. **Olsen, C.A., Franzyk, H., Jaroszewski, J.W.** N-alkylation reactions and indirect formation of amino functionalities in solid-phase synthesis. *Synthesis*. 2005, 16, S. 2631.
106. **Hirsch, J.D., Eslamizar, L., Filanoski, B.J., Malekzadeh, N., Haugland, R.P., Beechem, J.M., Haugland, R.P.** Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: Uses for protein labeling, detection, and isolation. *Analytical Biochemistry*. 2002, 308, S. 343.
107. **Gray, N.S., Wodicka, L., Thunissen, A., Norman, T.C., Kwon, S., Espinoza, F.H., Morgan, D.O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S.H., Lockhart, D.J., Schultz, P.G.** Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science*. 1998, 281, S. 533.
108. **Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R.** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994, 78, S. 1027.
109. **Sabat, M., Vanrens, J.C., Clark, M.P., Brugel, T.A., Maier, J., Bookland, R.G., Laufersweiler, M.J., Laughlin, S.K., Golebiowski, A., De, B., Hsieh, L.C., Walter, R.L., Mekel, M.J., Janusz, M.J.** The development of novel C-2, C-8, and N-9 trisubstituted purines as inhibitors of TNF- α production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006, 16, S. 4360.
110. www.pdb.org. [Online] RCSB Protein Data Bank.
111. **Abd El Wahed, A., Beutling, U., Bremer, C.M., Zvirbliene, A., Glebe, D., Gerlich, W.H., Frank, R., Fritz, H.-J. und Hunsmann, G.** *Poster: Identification of HBV epitopes via a rapid microchip assay reveals large differences in the immune response to yeast-derived HBsAg and natural or mammalian cell-derived HBsAg*. Tours, Frankreich: International Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses : s.n., 2009.
112. **Tillinghast, G. W.** Microarrays in the clinic. *Nature Biotechnology*. 2010, 28, S. 810.

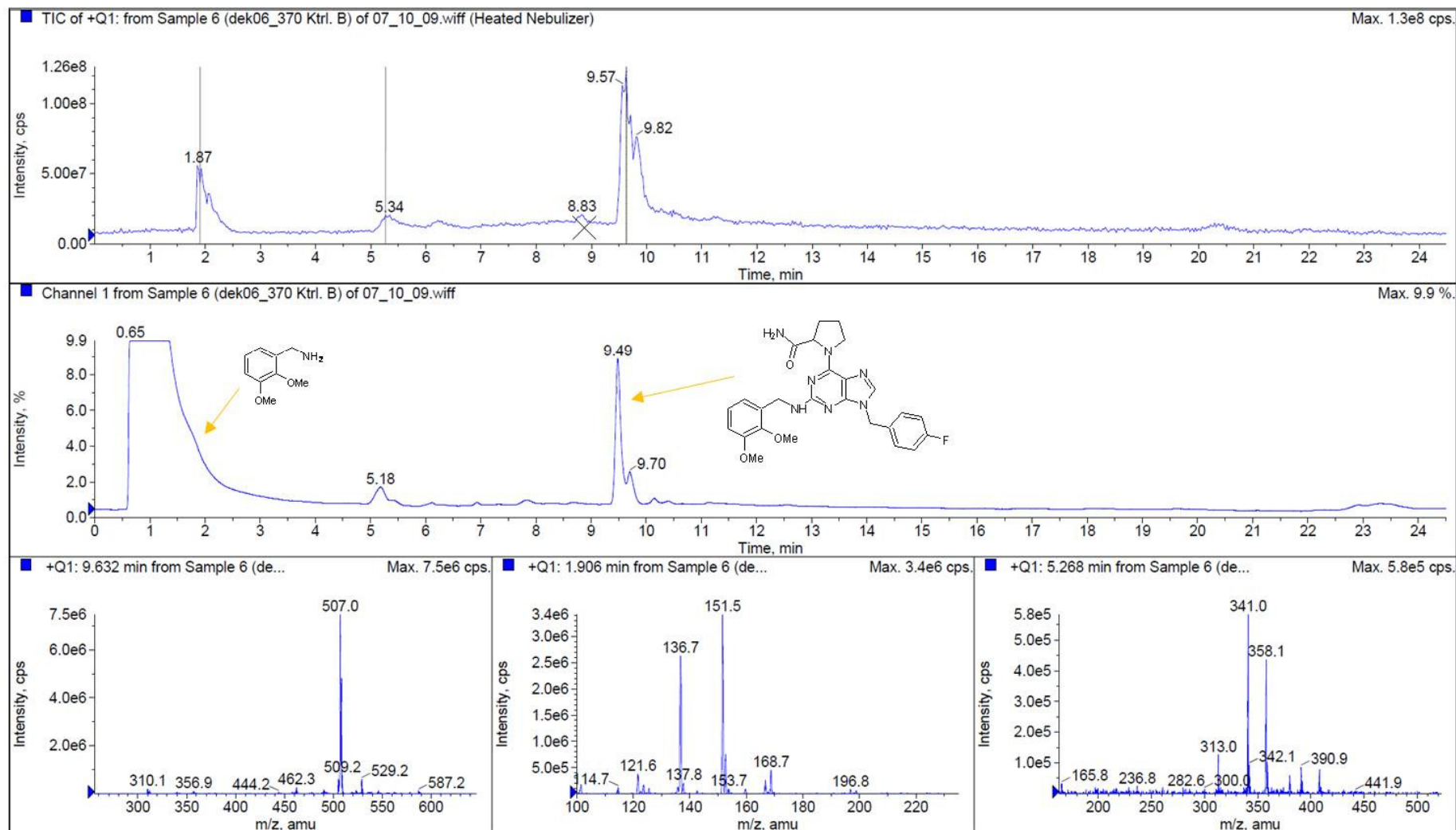
Anhang 1

Kontrollposition: A



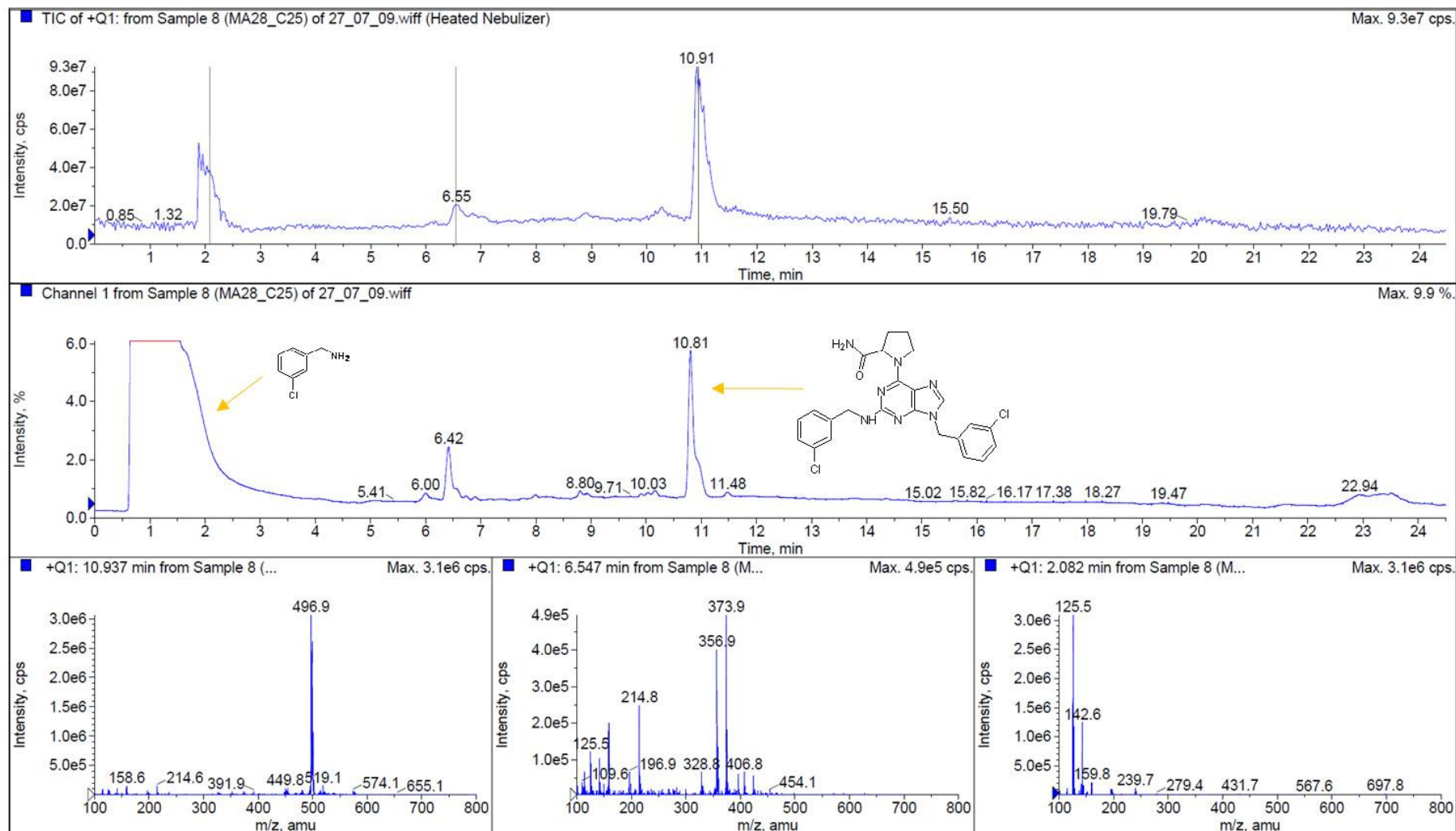
Anhang 2

Kontrollposition: B



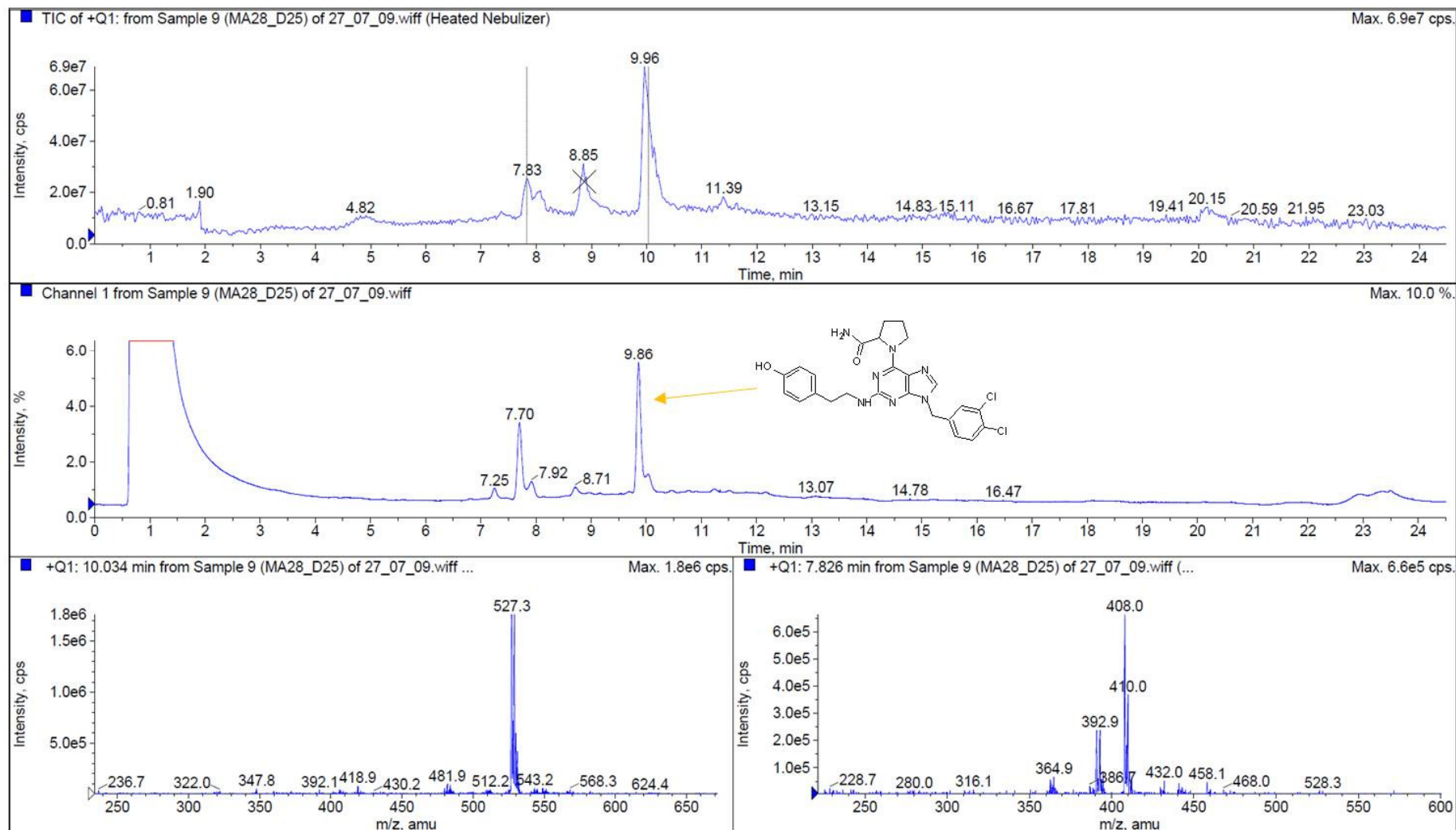
Anhang 3

Kontrollposition: C



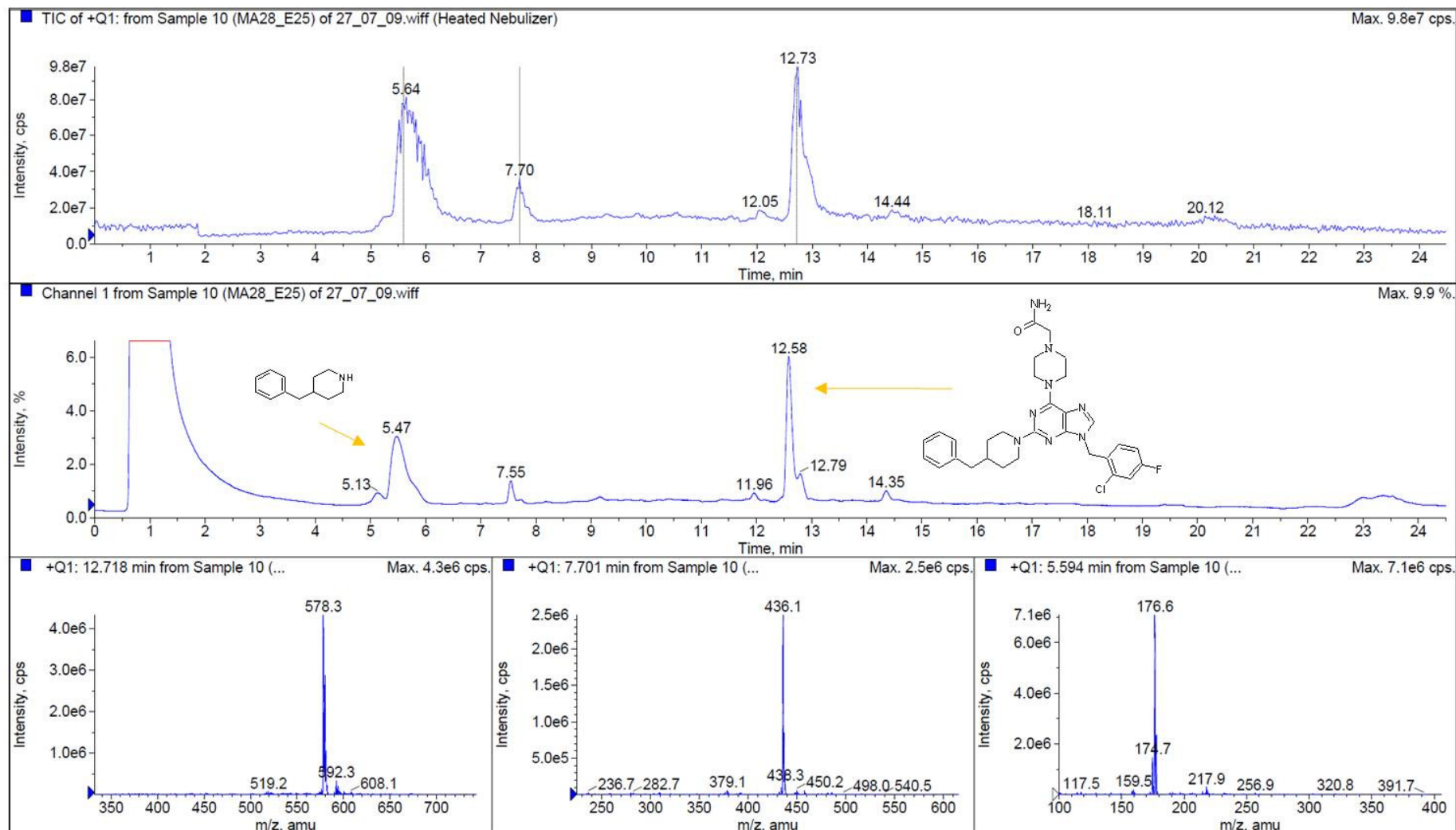
Anhang 4

Kontrollposition: D



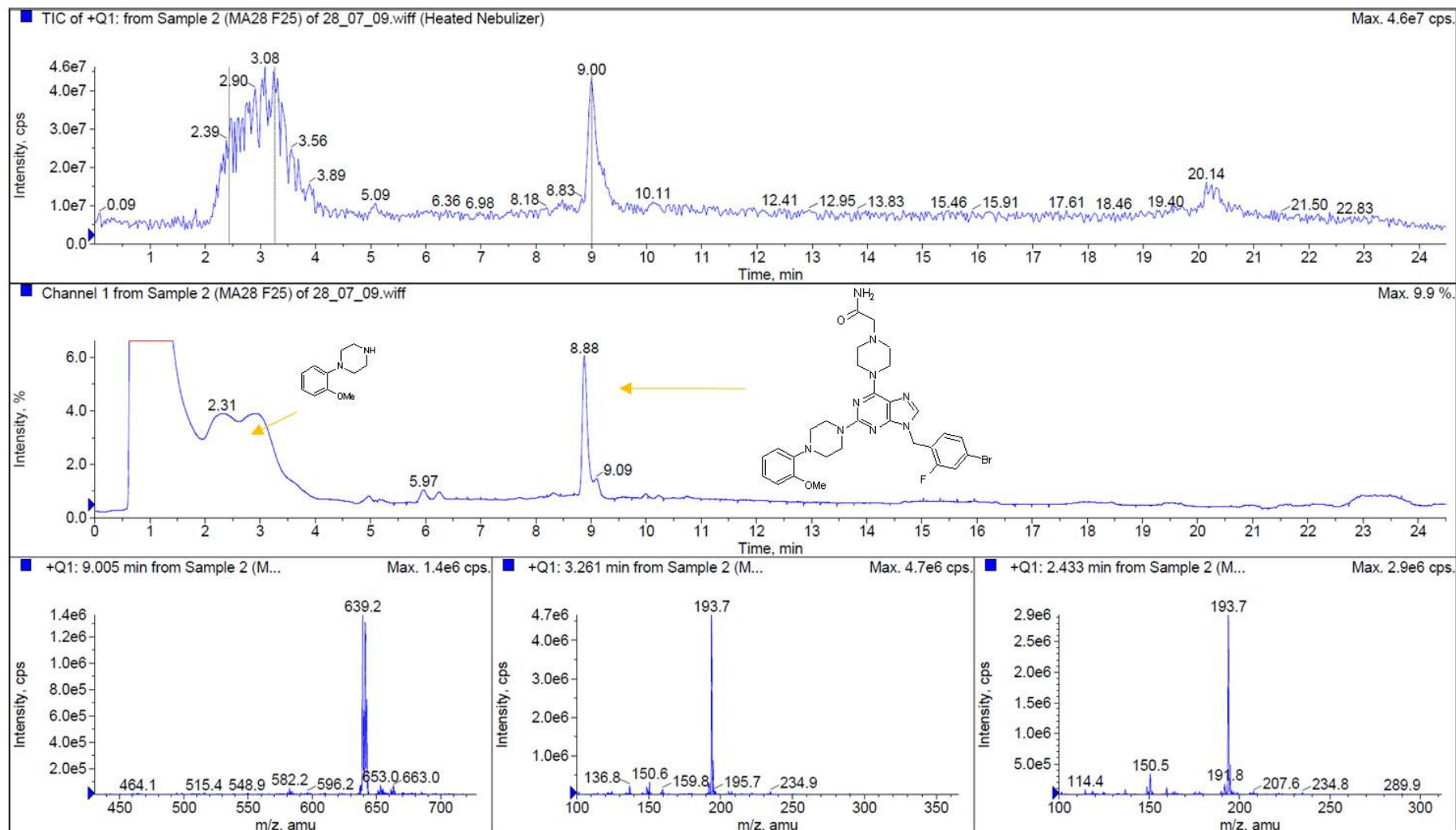
Anhang 5

Kontrollposition: E



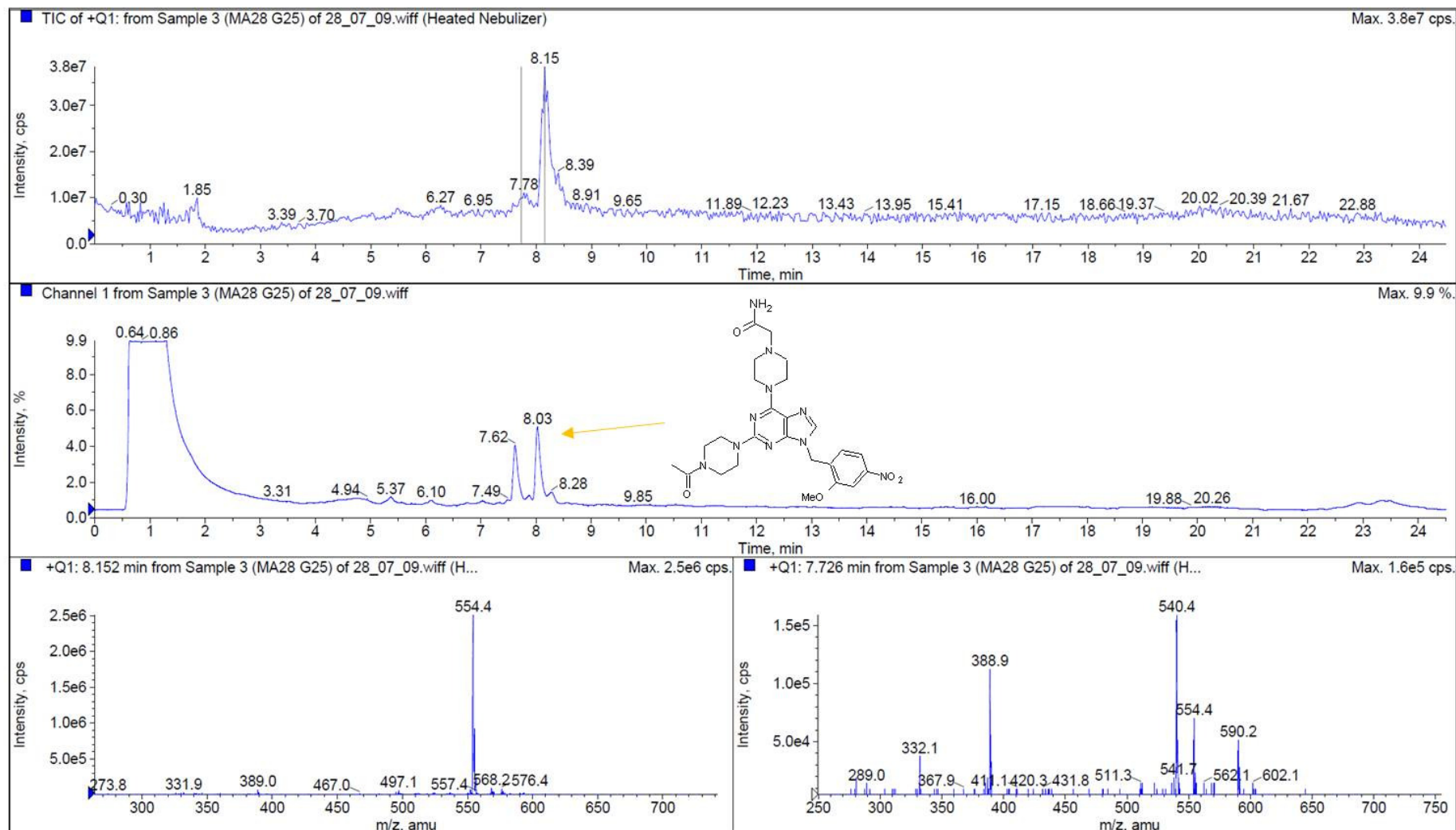
Anhang 6

Kontrollposition: F



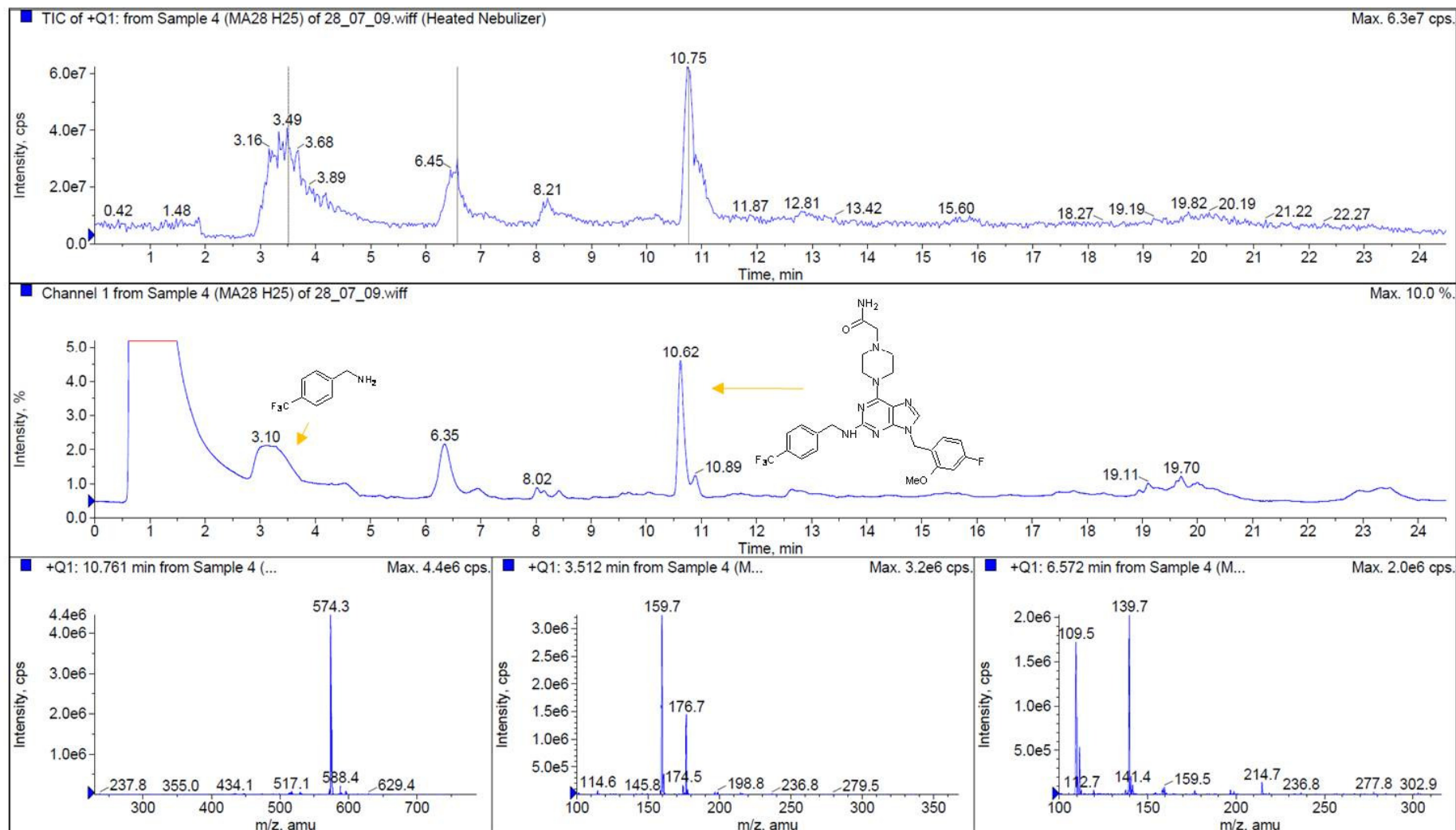
Anhang 7

Kontrollposition: G



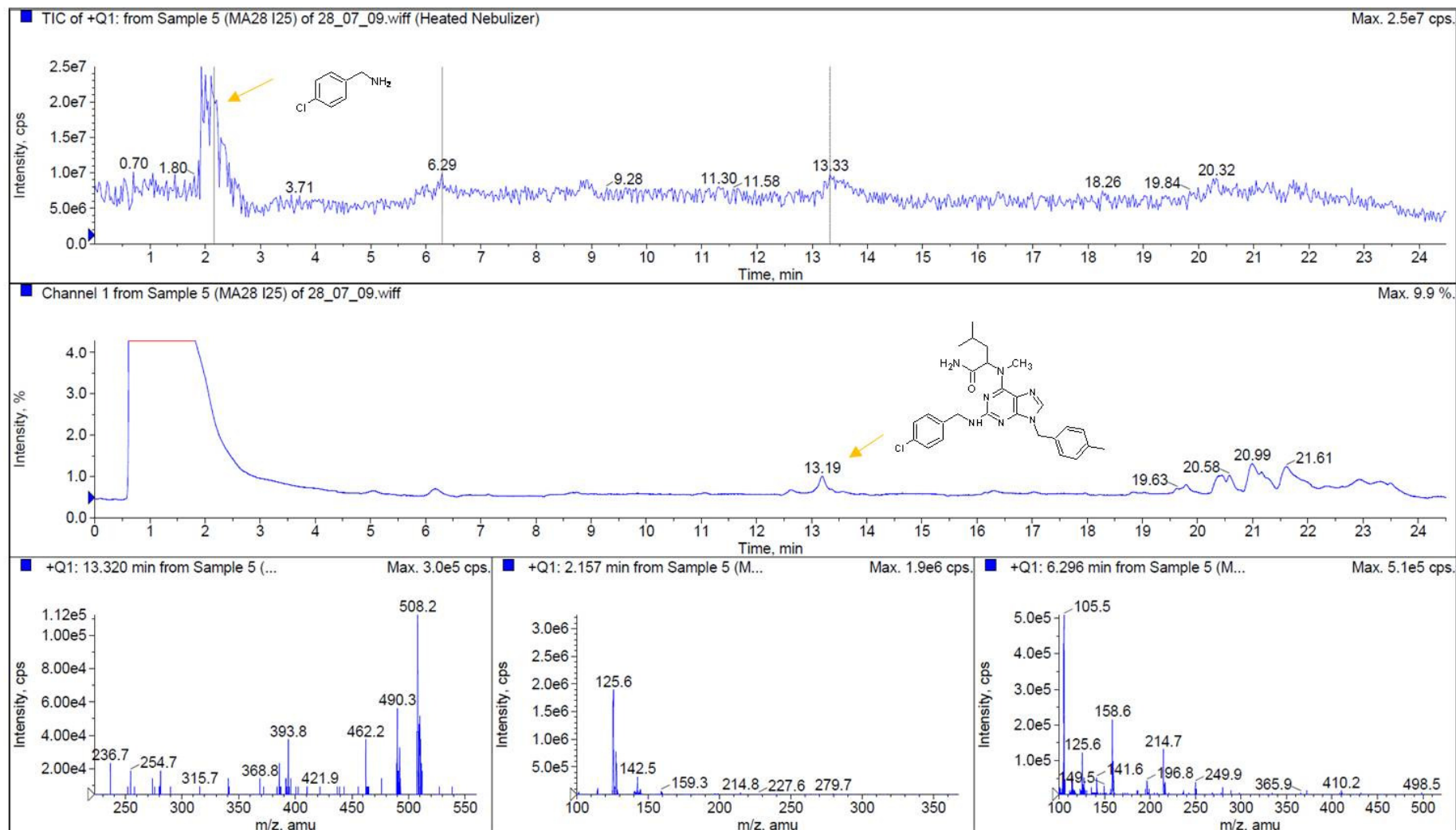
Anhang 8

Kontrollposition: H



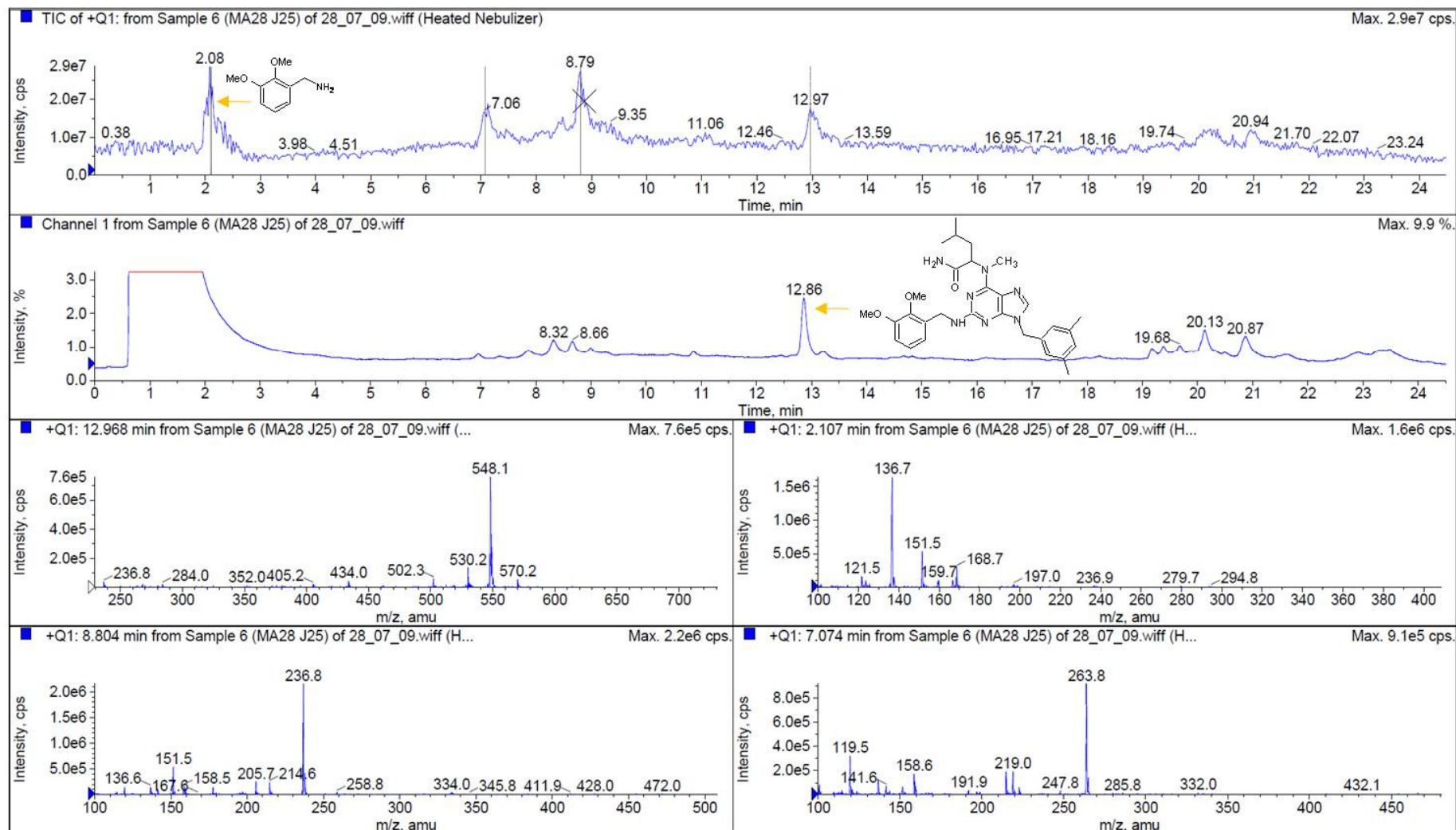
Anhang 9

Kontrollposition: I



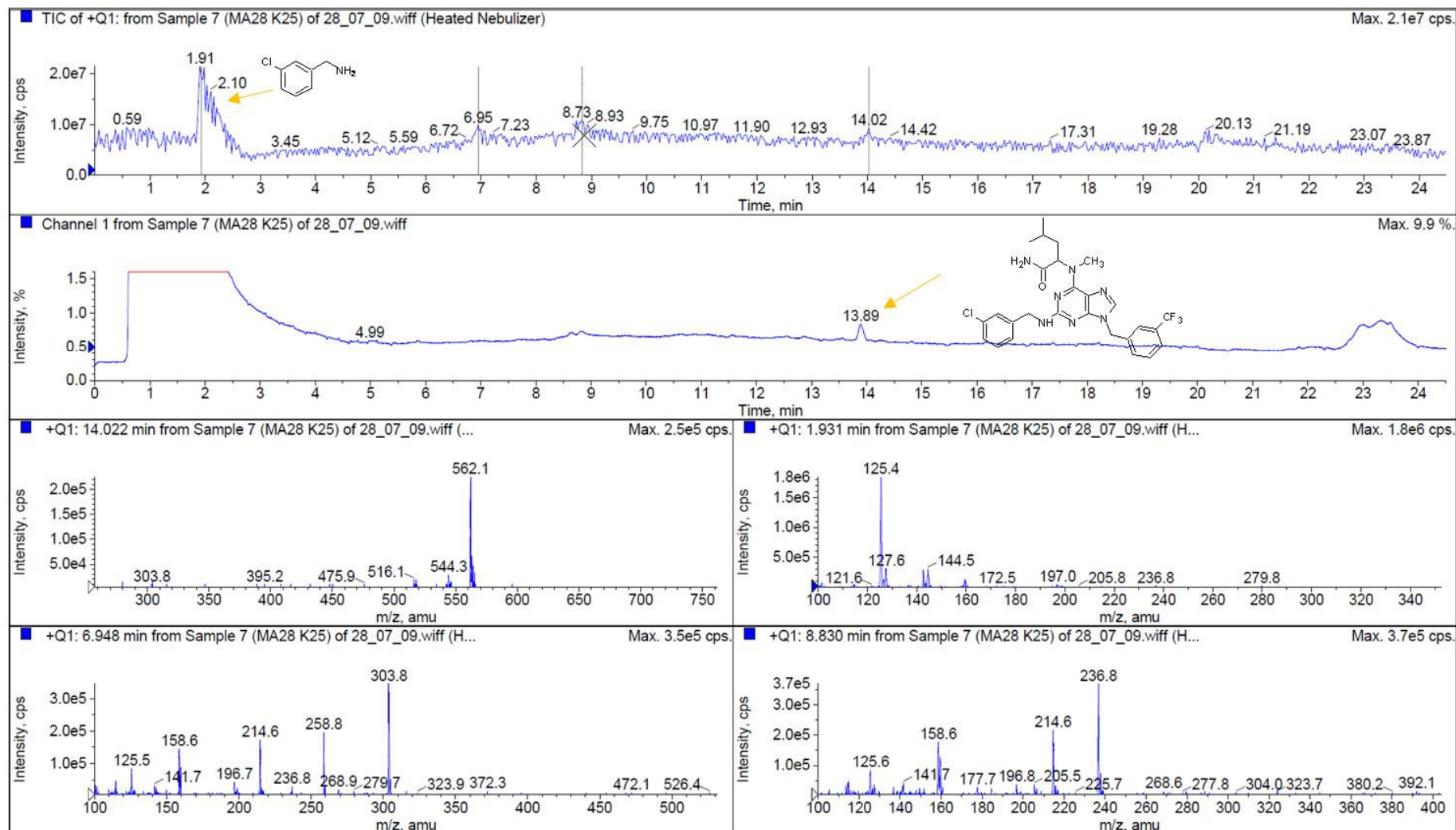
Anhang 10

Kontrollposition: J



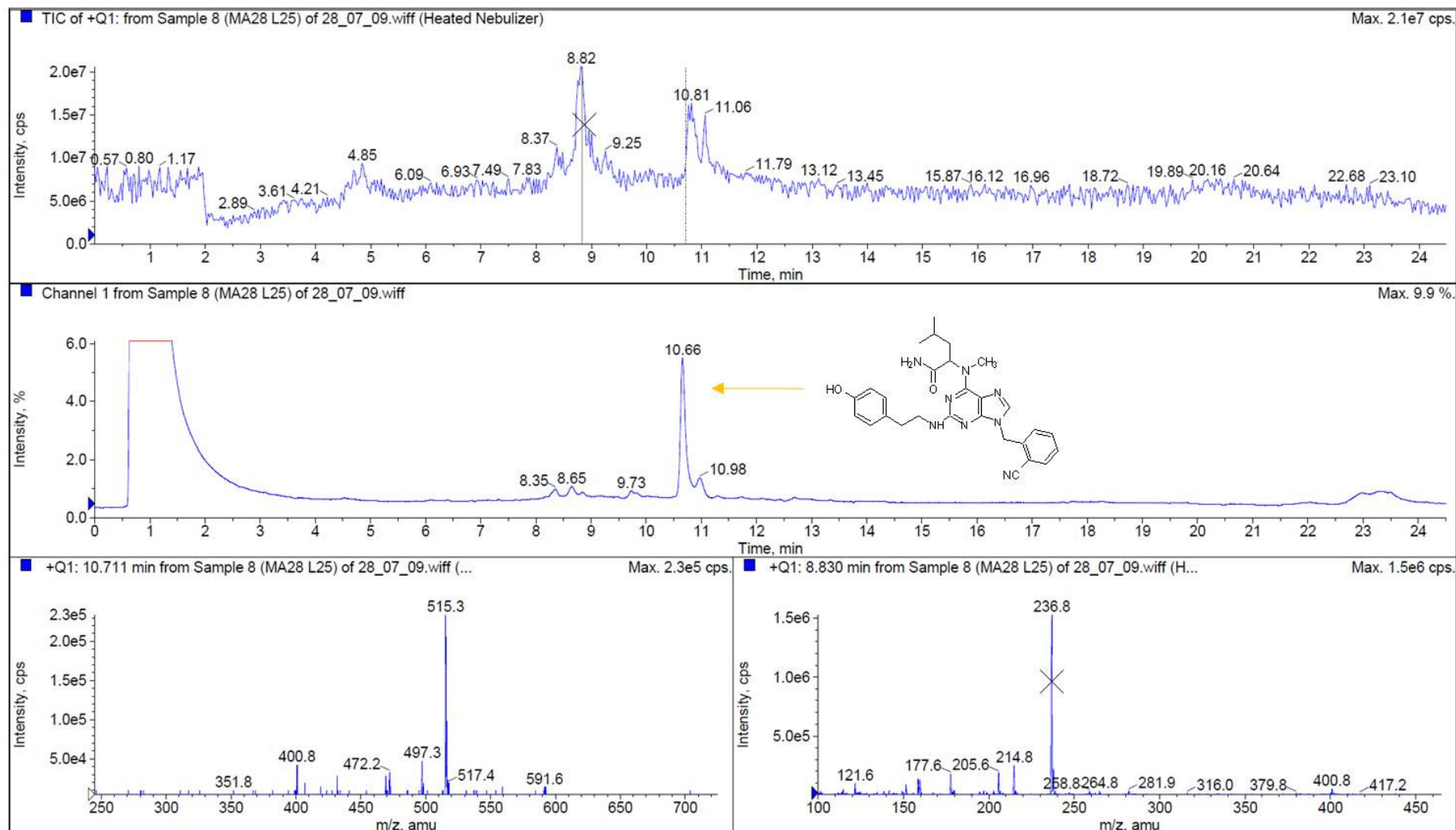
Anhang 11

Kontrollposition: K



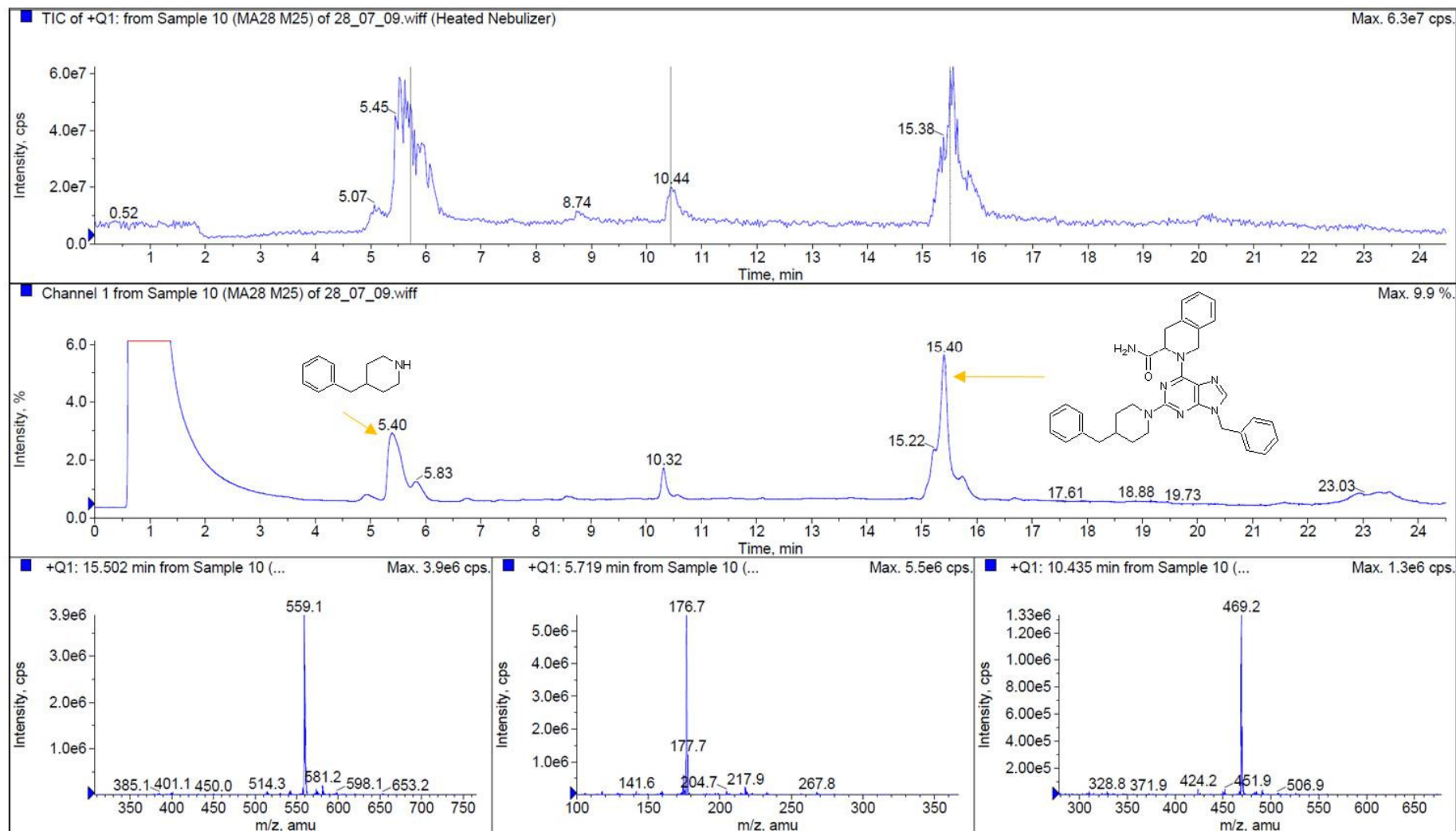
Anhang 12

Kontrollposition: L



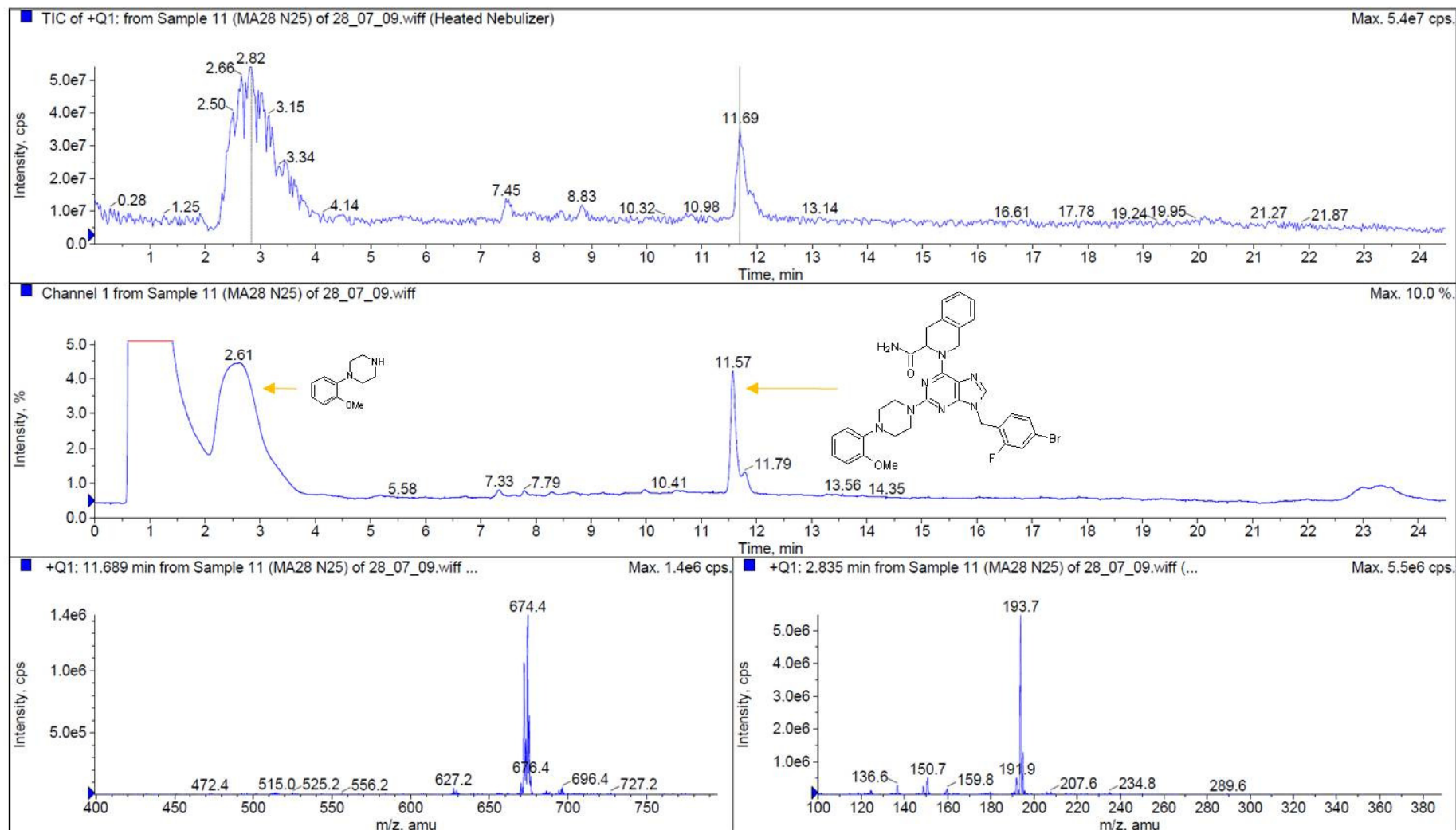
Anhang 13

Kontrollposition: M



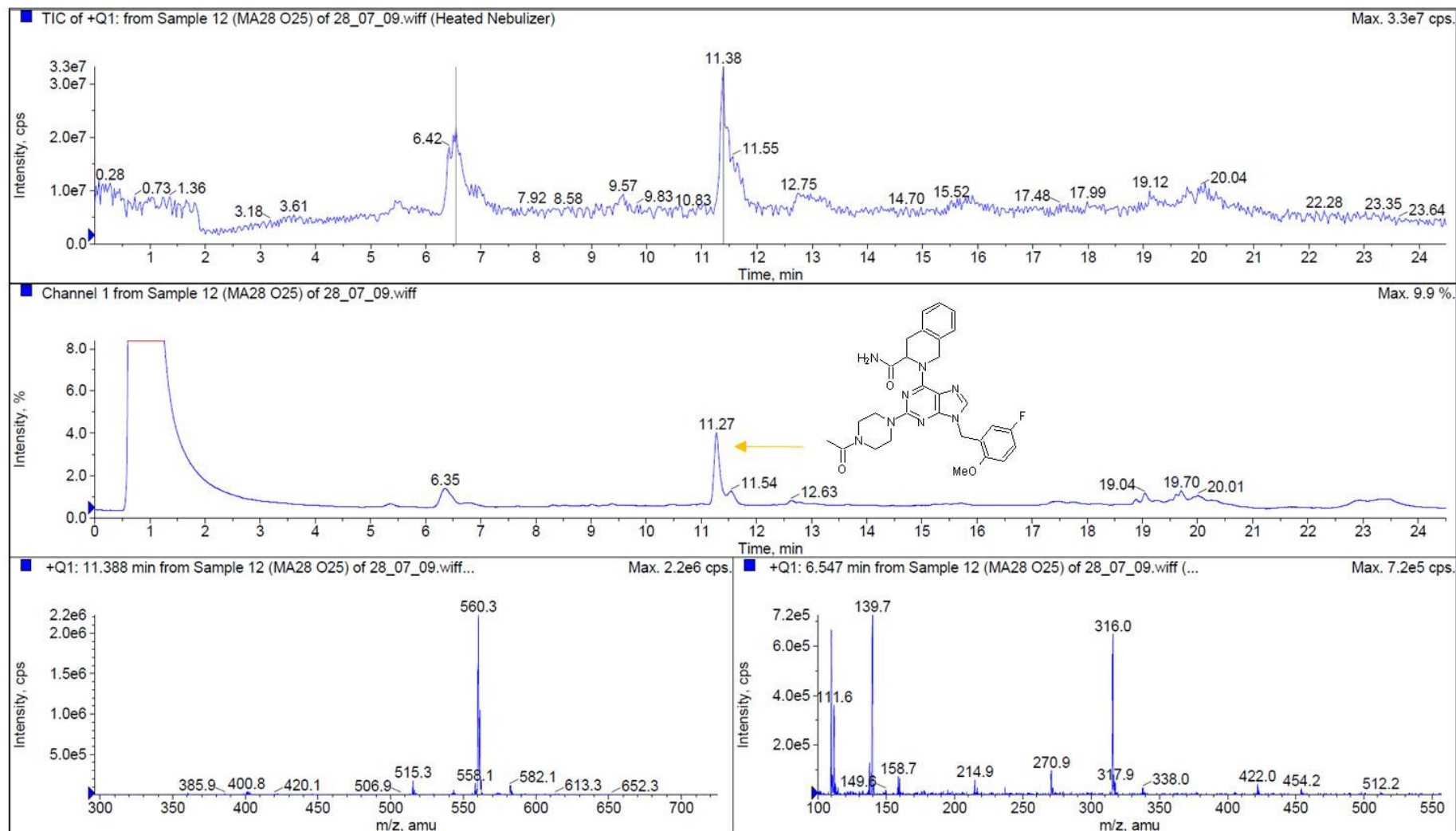
Anhang 14

Kontrollposition: N



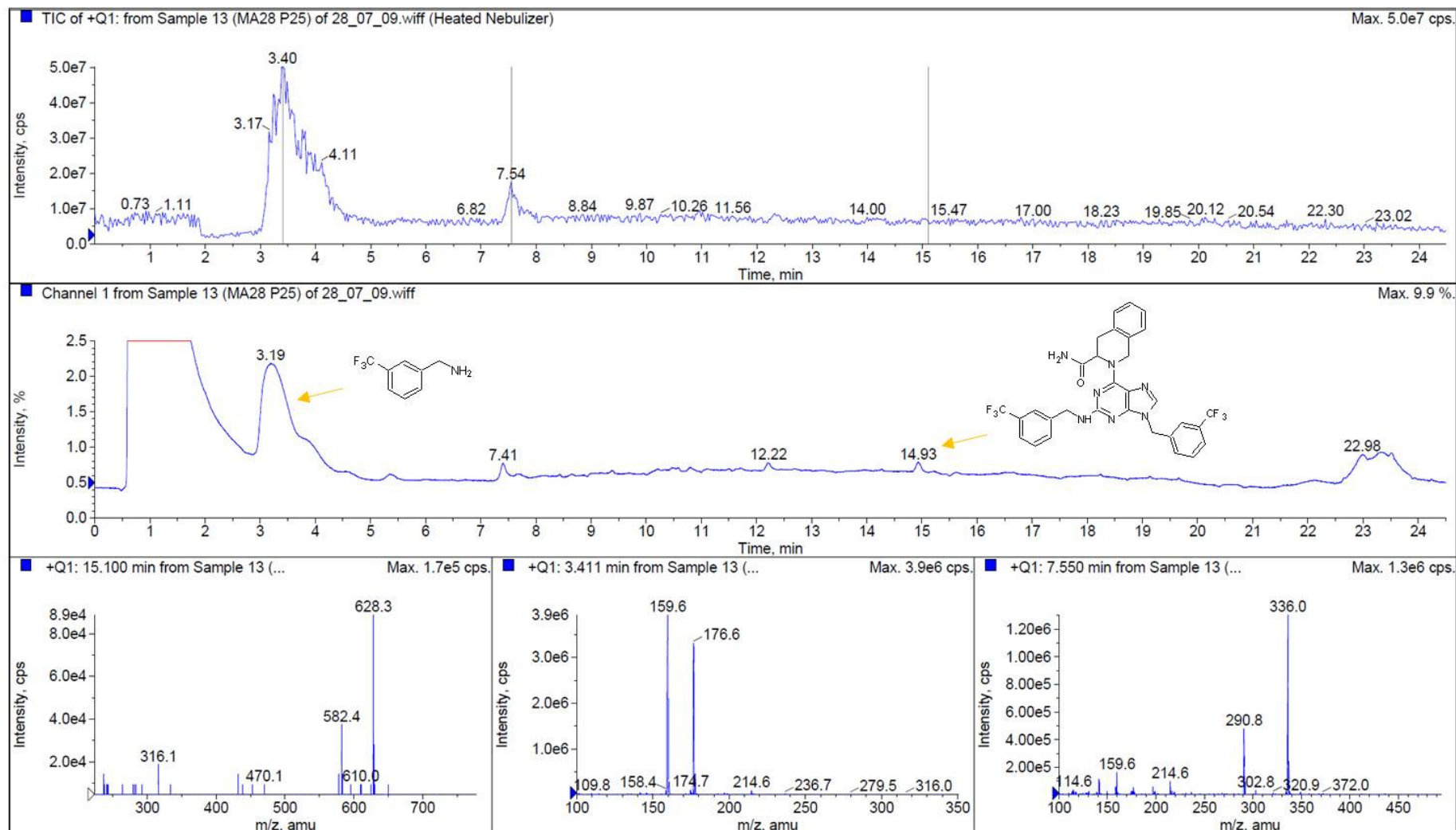
Anhang 15

Kontrollposition: O



Anhang 16

Kontrollposition: P



Anhang 17

Datentabelle der Docking-Rechnung

File containing a listing of the fitness of the top-ranked

individual for each ligand docked in GOLD.

#

Format is:

#

# Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	time	File name	Ligand name	
75.60	1.86	68.78	0.00	-20.84	720.037	'./gold_soln_Koska_Purin-Hit1_m1_3.mol2'	'	DRG '
64.56	0.95	56.24	0.00	-13.71	664.442	'./gold_soln_Koska_Purin-Hit2_m1_8.mol2'	'	DRG '
72.61	0.43	68.28	0.00	-21.70	707.636	'./gold_soln_Koska_Purin-Negativ1_m1_5.mol2'	'	DRG '
62.16	0.61	64.78	0.00	-27.52	839.172	'./gold_soln_Koska_Purin-Negativ2_m1_8.mol2'	'	DRG '

Danksagung

Meinem Betreuer Dr. Ronald Frank danke ich für die interessante und herausfordernde Themenstellung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. Ursula Bilitewski danke ich für die Ausübung der Funktion als Mentorin und Referentin, sowie für die Teilnahme an der Promotionskommission. Prof. Dr. Stefan Schulz möchte ich für die Übernahme des Koreferats und für die Teilnahme an der Promotionskommission danken. Prof. Dr. Ulrich Engelhardt danke ich für die Teilnahme an der Promotionskommission und die Ausübung des Vorsitzes.

Bei Dr. Robert Geffers und PD Dr. Manfred Höfle bedanke ich mich für die Bildung des Thesis Komitees und die wissenschaftliche Anleitung meiner Arbeit.

Dr. Thomas Schulze vom Thüringischen Institut für Textil- und Kunststoff-Forschung danke ich für die freundliche Bereitstellung von Fasermaterialien, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellen. Weiterhin danke ich ihm für seine Flexibilität und seinem Engagement.

Anna Rinkel möchte ich für ihre Durchführung von Faserquerschnitten danken. Dr. Joachim Reichelt danke ich für die Docking-Rechnungen. Für die elektronenmikroskopischen Messungen danke ich Dr. Heinrich Lünsdorf, Brigitte Kornak danke ich für die Durchführung der Peptidsynthese.

Besonderer Dank gilt Ulrike Beutling, die mir sowohl in praktischen, als auch theoretischen Fragestellungen häufig eine große Hilfe war und häufig die helfende Hand bei der Bewältigung technischer Probleme darstellte. Stichwort „LuCia“ – seit 2010 musste die Quelle vermutlich nie wieder geputzt werden. Doktorand des Monats eben. Grüße an Holly! Ferner danke ich Edelgard Schmeißer für die methodische Einführung während der Diplomarbeit und ihre allgegenwärtige Freundlichkeit, Toleranz und Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labors. Denkst Du auch noch manchmal an die Schwierigkeit des Einparkens und an 100 Pakete Laborhandschuhe? Und: Freitag, 13 Uhr – „Wie? Jetzt schon??“

Der gesamten Arbeitsgruppe CBIO möchte ich für die einmalig schöne Arbeitsatmosphäre danken. Mindestens genauso wichtig wie Eure fachliche Unterstützung und Motivierung waren dabei die entspannten Gespräche am sonnigen Mittagstisch, und der Austausch über Gott und die Welt – auch auf dem Drahtesel.

Claudia, Dir möchte ich für Deine Liebe und die fortwährende Unterstützung während meiner Promotionszeit danken, und dafür, dass Du es bewältigt hast, mich in den letzten Wochen und Monaten zu ertragen. Nicht zu vergessen, dass Du meinen Teil der Hausarbeit auch noch übernommen hast – die Revenge gilt hiermit als versprochen.

Natürlich gilt mein großer Dank auch meinen lieben Eltern Ria und Alois, die immer an mich geglaubt haben.

Den Titel gibt's für's Durchhalten.

Das ist geschafft!

Lebenslauf

Denis Grote-Koska (geb. Koska)

Geburtsdatum: 28.09.1981 (Salzgitter)

Ausbildung:

- | | |
|-----------------|---|
| 10.2006-01.2010 | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) /
Technische Universität Braunschweig (TU BS) <ul style="list-style-type: none">▪ Promotionsstudium im Fach Chemie an der Fakultät für Lebenswissenschaften (TU BS)▪ Anfertigung der Doktorarbeit (HZI) in der Arbeitsgruppe Chemische Biologie unter Betreuung von Dr. Ronald Frank:
<i>„Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Herstellung von Mikroarrays für die diagnostische und analytische Anwendung“</i> |
| 27.09.2006 | TU BS <ul style="list-style-type: none">▪ Abschluss des Studiums der Chemie mit dem Diplom (Diplom Chemiker) |
| 03.2006-09.2006 | HZI <ul style="list-style-type: none">▪ Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Chemische Biologie von Dr. Ronald Frank:
<i>„Chemische Synthese einer Chinoxalin-Bibliothek im Microarray-Format“</i> |
| 02.03.2004 | TU BS <ul style="list-style-type: none">▪ Abschluss Grundstudium (Vordiplom) |
| 10.2001-09.2006 | TU BS <ul style="list-style-type: none">▪ Studium der Chemie mit Vertiefung im Fach Biochemie/ Biotechnologie |
| 1994-2001 | Gymnasium am Fredenberg, Salzgitter <ul style="list-style-type: none">▪ Abitur |
| 1992-1994 | Orientierungsstufe an der Krähenriede, Salzgitter |
| 1988-1992 | Grundschule am Kranichdamm, Salzgitter |

Berufliche

Tätigkeiten:

- | | |
|-----------------|--|
| seit 02.2010 | Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover <ul style="list-style-type: none">▪ Wissenschaftlicher Mitarbeiter |
| 03.2006-01.2010 | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig <ul style="list-style-type: none">▪ Wissenschaftlicher Mitarbeiter |
| 08.2003-12.2005 | Bildungshaus Schulbuchverlage Westermann Schroedel Diesterweg
Schöningh Winklers GmbH, Braunschweig <ul style="list-style-type: none">▪ Wissenschaftliche Hilfskraft in der naturwissenschaftlichen Redaktion |